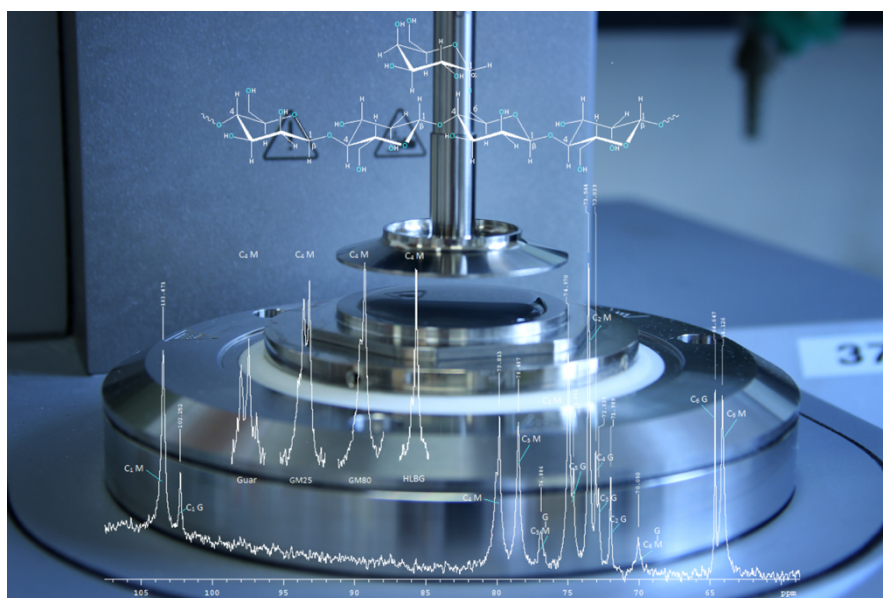


ETUDE DES RELATIONS ENTRE LA STRUCTURE DES GALACTOMANNANES DE CAROUBE ET LEURS PROPRIETES FONCTIONNELLES



Sébastien GILLET

COMMUNAUTE FRANCAISE DE BELGIQUE
UNIVERSITE DE LIEGE – GEMBLoux AGRO-BIO TECH

ETUDE DES RELATIONS ENTRE LA STRUCTURE DES
GALACTOMANNANES DE CAROUBE ET LEURS
PROPRIETES FONCTIONNELLES

Sébastien GILLET

Dissertation originale présentée en vue de l'obtention du grade de docteur en
sciences agronomiques et ingénierie biologique

Promoteur : Christophe BLECKER

Année civile : 2018

Résumé

De la gomme de caroube brute a été purifiée et extraite de façon fractionnée et soustractive, à deux températures différentes (25 °C et 80 °C), afin d'obtenir deux fractions distinctes (GM25 et GM80). Celles-ci ont été caractérisées structurellement. Les deux fractions récoltées présentent des structures proches, mais néanmoins différentes. Ainsi, la fraction GM80 se distingue de la fraction GM25 par des longueurs de chaînes plus importantes. Elle est aussi moins substituée en galactose et présente surtout une alternance de zones non substituées et densément substituées sur la chaîne principale du polymère (là où la répartition des substituants sur la fraction GM25 est légèrement plus homogène).

Le présent travail a ensuite mis en exergue que ces différences de structure relativement faibles au sein du même polysaccharide de base génèrent des comportements physico-chimiques fort différents en milieu aqueux, à différents niveaux d'observation (solutions diluées, solutions concentrées et état gel). L'analyse de ces informations a plus particulièrement démontré que des interactions spécifiques (« alkali labile » et non-covalentes) existent entre les chaînes de galactomannanes, principalement pour la fraction GM80. Celles-ci ont pour origine la présence d'un nombre plus important de zones non-substituées qui interagissent entre elles. La fractions GM25 est plus influencée par son poids moléculaire. Ces mêmes interactions au sein de la fraction GM80 diminuent son rayon hydrodynamique et sa viscosité intrinsèque en régime dilué, mais favorisent l'apparition d'un réseau hyperenchevêtré en régime concentré qui se caractérise par une viscosité dynamique et une viscoélasticité plus importantes.

En s'intéressant également aux propriétés réactionnelles en conditions subcritiques (assimilées à des conditions d'hydrolyse acide), ce travail a également démontré que les fractions GM25 et GM80 génèrent des cinétiques d'hydrolyse différentes. Un degré de substitution en galactose plus important semble préserver – ou du moins ralentir – l'auto-hydrolyse et la rupture des liaisons glycosidiques. Pourtant les substituants galactosyls sont plus facilement hydrolysés et libérés dans le milieu. Cela semble répondre à une loi statistique, mais est également fortement influencé par l'effet anomère. La fraction GM80 libère en outre plus de galactose que la fraction GM25 qui en contient pourtant plus, initialement. A nouveau, les raisons semblent liées à la structure fine des polymères, et en particulier aux zones densément substituées de la fraction GM80. Celles-ci généreraient un encombrement stérique qui affaiblit les liaisons des galactoses tandis que les zones non-substituées généreraient une conformation (effet hydrophobe) qui expose les galactosyls de façon plus importante aux conditions drastiques du milieu.

Abstract

Crude locust bean gum was purified and extracted in a fractionated and subtractive manner at two different temperatures (25 ° C and 80 ° C) in order to obtain two distinct fractions (GM25 and GM80). These were structurally characterized. Both fractions have close – but different – structures. Thus, the GM80 fraction differs from the GM25 fraction by longer chain lengths. GM80 is also less substituted in galactose and has an alternation of unsubstituted sequences and densely substituted regions on the main chain of the polymer (GM25 distribution of substituents is slightly more homogeneous).

The present work highlighted that these relatively small structural differences within the same initial polysaccharide generate very different physicochemical behaviors in aqueous media, at different observation levels (diluted solutions, concentrated solutions and gel state). Information analysis has demonstrated in particular that specific interactions (alkali-labile and non-covalent) exist between the galactomannan chains, mainly for the GM80 fraction. These originate from the presence of a larger number of unsubstituted regions that interact between them. The GM25 fraction is more influenced by its molecular weight. These same interactions within the GM80 fraction decrease their hydrodynamic radius and intrinsic viscosity in the dilute regime but promote the appearance of a concentrated hyperentangled network characterized by a greater dynamic viscosity and viscoelasticity.

By studying also the reaction properties under subcritical conditions (assimilated to acid hydrolysis conditions), this work has also demonstrated that the GM25 and GM80 fractions generate different kinetics of hydrolysis. A greater degree of galactose substitution seems to preserve - or at least slow down - the auto-hydrolysis and the breakdown of glycosidic bonds. Galactosyl substituents are yet more easily hydrolyzed and released into the medium. This seems to follow a statistical law, but it is also strongly influenced by the anomeric effect. The GM80 fraction also released more galactose than the GM25 fraction, which initially contained more. Again, the reasons seem to be related to the fine structure of the polymers, and in particular to the densely substituted areas of the GM80 fraction. These would generate a steric hindrance that weakens the galactose bonds while the unsubstituted regions would generate a conformation (hydrophobic effect) which exposes the galactosyls more importantly to the drastic environment.

Remerciements

Plusieurs personnes, à différents niveaux, ont apporté une contribution significative à ce travail de recherche doctorale. Par ces quelques lignes, je tenais à exprimer à chacune ma gratitude.

- Christophe Blecker, mon promoteur, que je remercie pour trois raisons principales, à savoir : de m'avoir guidé et orienté dès le début de ma thèse ; pour son excellence scientifique ainsi que pour la pertinence et la qualité de ses remarques qui ont été une source d'amélioration continue de mon travail et de mes compétences scientifiques ; pour son honnêteté et son soutien indéfectible, même dans les situations les plus complexes ou délicates.
- Michel Paquot, mon premier promoteur jusqu'à son admission à la retraite. C'est grâce à (ou à cause de) lui que j'ai été embarqué dans cette galère. Je lui suis reconnaissant de la confiance accordée lors de mon engagement et durant mes premières années en tant qu'assistant, ainsi que de l'environnement de travail performant et agréable qu'il a réussi à mettre en place en Chimie Biologique Industrielle. C'est également à lui que je dois le choix de cette thématique et ses nombreux conseils ont été cruciaux pour la structurer.
- Mario Aguedo, mon collègue. Un pur scientifique. Le meilleur. La qualité et la rigueur de ses relectures, ainsi que ses conseils ont joué un rôle prépondérant dans l'acceptation des publications scientifiques présentées dans cette thèse. Sa disponibilité et sa serviabilité sont également à souligner.
- Isabelle Vandevreken et Virginie Byttebier que je remercie pour leur soutien technique d'excellente qualité et leur rigueur au cours de ces nombreuses années. Je remercie également Coralie Randaxhe qui a contribué techniquement à la réalisation du dernier chapitre.
- Toutes les autres personnes qui, de près ou de loin, ont contribué à ce travail. Je pense en particulier aux membres du jury de thèse et aux reviewers scientifiques que je salue pour le temps qu'ils ont eu la gentillesse de me consacrer.

Cette thèse de doctorat ne représente cependant qu'un des aspects de mon passage dans notre belle institution. Elle est probablement l'étape ultime et terminale, mais il y en a eu beaucoup d'autres (avant et en parallèle). Je profite donc de l'occasion de ce travail de clôture pour remercier, chronologiquement, toutes les personnes avec qui j'ai eu la chance d'interagir lors de mon parcours gembloutois et qui – sans le

savoir parfois – ont grandement contribué à ce que je suis devenu depuis mes 17 ans. Il était important pour moi de simplement les citer :

- Mes amis des premières heures : Christophe Burton, Daphné Handereck, François Lehaire, Pierre Salmon, Martin Giaux, Anne Deligne, Laura Hirtt. *Les chasses aux insectes et aux plantes, le mess, les blocus, les premières cénobites, le kot...*
- Les Professeurs qui m'ont influencé : Patrick Dujardin, Michel Marlier, Michel Paquot, Philippe Thonart, Claude Deroanne, Christophe Blecker. *La passion pour la botanique, le choix de la chimie, l'intérêt pour l'industrie, l'approche globale, la stratégie, l'excellence scientifique...*
- Mes amis de l'AG : Benjamin de Potter, Sébastien Houdart, Steve Weyne, Alix de Brogniez, Joëlle Vandersteen, Joséphine Martin, Olivier Henriët, Benjamin Dumont, Patrick Eloundou, Guillaume Defays, Tristan Ratz, Mathieu Deneufbourg, Yannick Léonard, Fabrice Régibo, Céline Poncelet, Benoit Seutin, Steve Bernard, Maxime Colin, Christian Hick, et tant d'autres. *Les offsets, l'office des cours, le comité AG, l'implication, les belles années bières & belote...*
- Mes amis du CB : Samuel Quievy, Helene Flamand, Quentin Mathy, Pierre-Yves Guesse, Morgan Abras, Claire Olivier, Adrien Michez, Florent Asquinazi, Antoine Marchal, Ludovic Sablon, Gino Aufiero, Christelle Francis, et tant d'autres. *Le plus grand, le contre-la-pompe, les power-points, les euphons, les tondeuses, le scotch brun, le noir&vert, Closset, les calotins, le quintal...*
- L'équipe du TFE : Jean-Marc Aldric, Franck Delvigne, Jacqueline Destain, et toute l'équipe. *Les fermenteurs, le MTBE, la pause-café, les tournois de foot, MATLAB, les soirées CWBI, les blagues, la bonne humeur...*
- Mes anciens collègues directs du CBI et indirects de la Techno : Pascal Laurent, Magali Deleu, Caroline Vanderghem, Mario Aguedo, Catherine Chemotti, Virginie Byttebier, Isabelle Vandevreken, Eric Groignet, Nicolas Jacquet, Frederic Meyer, Pierre-Louis Bombeck, Mathilde Simon, Danielle Brunin, Bernard Wathelet, Alexandre Schandeler, Diana Levicek, Florian Tiappi, Thomas Happi, Dorothée Goffin, Romain Thomas, Sébastien Ronkart, Sabine Danthine, Lynn Doran, Sandrino Filocco, etc. *Rendement-efficacité-publications, le café serré, le Cameroun, les soirées CBI, le tournoi de belote, les TP, la carboglace, le mess...*
- Mes amis du sport : Vincent Rolland, Olivier Roiseux, Christophe Baronheid, Gilles Colinet, et tous les autres. *L'ASAG, le football corporatif, les barbecues, les remises de trophées, les soupers du GRCPN, mon régime de 30 kg, le Guy Toussaint, la bande à Thierry...*

- Mes collègues et amis de Yale : le Professeur Paul Anastas, Laurene Petitjean, Jason Lam, Samuel Collom, Vincent Escandre, et tous les autres. *GPSCY, the fall, the beach, Fuck, I'm drunk, Racconn team, Go Bulldogs, Green Chem, DC, the decorative towels...*
- Tous les autres collègues de la faculté ou de l'université que j'ai eu la chance de croiser sur mon chemin, pour leur attitude bienveillante ou pour les interactions constructives que nous avons pu avoir : Helene Soyeurt, Cedric Vermeulen, Philippe Lejeune, Jean-Yves De Vleeschouer, Frédéric Francis, Marie-Laure Fauconnier, Philippe Maesen, Tina Valastro, Bernard Bodson, Frédéric Lebeau, Georges Lognay, Jean-Paul Barthélémy, François Béra, Dany Trisman, Vincent Hote, Nicolas Mabon, Marc Culot, Yves Brostaux, Alain Stevens, Jean-Paul Wathelet, Aurore Degré, Ludwig Vansteen, Bernard Segers, Françoise Gourdien, Christian Damblon, Andrew Tatton, Fany Englebert, Stephanie Heuskin, Marianne Sindic, Quanah Zimmerman, Ariane Dukers, Philippe Lebailly, Thomas Dogot et tous les autres.

Finalement, j'en viens même à remercier Eric Schmitt & Aurore Martin. Ils ne s'en sont peut-être pas rendu compte, mais ils ont constitué ma plus grande source de motivation pour boucler ce travail.

Je terminerai par remercier ma famille et mes proches. C'est finalement grâce à eux que le parcours gembloutois a pu commencer et se poursuivre.

Je dédie ce travail à ma tante, le Professeur Madeleine Tyssens, qui va enfin pouvoir me laisser tranquille avec ça...

Table des matières

Résumé.....	4
Abstract	5
Remerciements	6
Table des matières.....	9
Liste des figures	10
Liste des tableaux.....	15
Liste des abréviations et symboles.....	17
Introduction, objectifs et stratégie.....	20
Influence du procédé d'extraction et de purification sur les caractéristiques et les propriétés d'une gomme de caroube.....	25
La relation structure chimique-propriétés physiques des galactomannanes extraits de la caroube.....	50
L'hydrolyse en milieu high temperature water (HTW).....	91
Impact of purification and fractionation process on the chemical structure and physical properties of locust bean gum.	110
Structure impact of two galactomannan fractions on their viscosity properties in dilute solution, unperturbed state and gel state.....	142
Structure impact of two galactomannan fractions on their degradation kinetics in high temperature water.....	176
Conclusions générales et perspectives	203

Liste des figures

Chapitre 1 : Influence du procédé d'extraction et de purification sur les caractéristiques et les propriétés d'une gomme de caroube.

Figure 1. Coupe transversale d'une graine de caroube. D'après Dakia et al., 2008. *Cross section in a carob seed. According to [4].*

Figure 2. Structure des galactomannanes de la gomme de caroube et de la gomme tara. D'après [21]. *Locust bean gum and tara gum galactomannan's structure. According to [21].*

Figure 3. Distribution des résidus galactoses sur la chaîne de mannoses. D'après [15]. (a) répartition régulière, (b) répartition aléatoire, (c) répartition en blocs uniformes. *Galactose distribution along the main chain of mannose. According to [15]. (a) regular arrangement, (b) random distribution, (c) distribution in uniform blocks.*

Figure 4. Schéma du processus d'extraction et de purification de la gomme de caroube. D'après [37]. *Process of extraction and solubilisation of the locust bean gum. According to [37].*

Figure 5. Composition moyenne en monomère de fractions de galactomannanes obtenues sur une large variété de sources de gomme de caroube, parfois par fractionnement de solubilité [33]. Avec l'autorisation d'Elsevier. *Average composition in monomer of galactomannan's fractions, obtained from a wide variety of source of locust bean gum, sometimes fractionated by solubility [33]. With permission from Elsevier.*

Figure 6. Masse moléculaire (déterminé par SEC) de fractions de gomme de caroube commerciale, solubilisée entre 5 °C et 65 °C [48]. Avec l'autorisation d'Elsevier. *Molecular weight (determined by SEC) of commercial locust bean gum fractions solubilized between 5 °C and 65 °C [48]. With permission from Elsevier.*

Chapitre 2 : La relation structure chimique-propriétés physiques des galactomannanes extraits de la caroube

Figure 1. Structure des galactomannanes de la gomme de caroube et de la gomme tara. Adapté d'après [76]. *Figure 1: Structure of locust bean and tara galactomannans. According to [76].*

Figure 2. Distribution des résidus galactoses sur la chaîne de mannoses : (A) répartition régulière, (B) répartition aléatoire, (C) répartition en blocs uniformes. Adapté d'après [1].
Figure 2: Galactose distribution along the main chain of mannose: (A) regular arrangement, (B) random distribution, (C) distribution in uniform blocks. According to [1].

Figure 3. Dégradation alcaline par : (A) β -élimination et méthylation, suivie par (B) hydrolyse acide, réduction et acétylation [64]. Avec l'autorisation d'Elsevier. *Figure 3 : Alkaline degradation by: (A) β -elimination and methylation followed by (B) acid hydrolysis, reduction and acetylation [64]. With permission of Elsevier.*

Figure 4. Conformation possible des galactomannanes en solution aqueuse et arrangement des chaînes latérales de galactosyles [56]. Avec l'autorisation d'Elsevier. *Figure 4 : Probable conformation of galactomannans in aqueous solution and arrangement of galactosyl side chains [56]. With permission of Elsevier.*

Figure 5. Les deux conformations des galactomannanes – en hérissé, les zones substituées – à gauche, la pelote aléatoire ; à droite, la forme en ruban [77]. Avec l'autorisation d'Elsevier. *Figure 5: The two conformations of galactomannans - the substituted areas are bristling – on the left, random coil, on the right, ribbon-like [77]. With the permission of Elsevier.*

Figure 6. Intervention des zones « lisses » dans les interactions intramoléculaires. Adapté d'après [48]. *Figure 6: Intervention of "smooth" areas in the intramolecular interactions. According to [48].*

Figure 7. Influence de la température sur la solubilité, après 2 heures de mise en solution, pour de la gomme brute et des particules de tailles différentes [32]. Avec l'autorisation d'Elsevier. *Figure 7: Influence of temperature on solubility, after 2 hours of solubilization, on crude gum and particles of different sizes [32]. With the permission of Elsevier.*

Figure 8. Degré de substitution en galactose de fractions de galactomannanes obtenues sur une large source de gomme de caroube, parfois par fractionnement [30]. Avec l'autorisation d'Elsevier. *Figure 8: Degree of galactose substitution of galactomannans fractions obtained on a wide source of locust bean gum, sometimes by splitting [30]. With the permission of Elsevier.*

Figure 9. Poids moléculaire (déterminé par SEC) de fractions de gomme de caroube commerciale, solubilisée entre 5 °C et 65 °C [31]. Avec l'autorisation d'Elsevier. *Figure 9: Molecular weight (determined by SEC) of commercial carob gum fractions, solubilized between 5 °C and 65 °C [31]. With permission of Elsevier.*

Figure 10. Illustration de différents régimes de concentration : A, solution diluée avec $c < c^*$ (molécules individuelles) ; B, molécules montrant un début de recouvrement $c \approx c^*$; C, molécules enchevêtrées $c > c^*$ [84]. Avec l'autorisation d'Elsevier. *Figure 10: Illustration of different concentration regimes: A, dilute solution with $c < c^*$ (individual molecules) ; B, molecules showing incipient overlap with $c \approx c^*$; C, entangled molecules with $c > c^*$ [84]. With permission of Elsevier.*

Figure 11. Structure proposée pour les gels de galactomannanes. Les régions non-substituées de la chaîne de mannane sont associées, comme dans un état solide, pour former des jonctions interchaînes, tandis que les régions substituées sont fortement hydratées, comme en solution, et empêchent la précipitation complète. Adapté d'après [89]. *Figure 11: Proposed galactomannan gels structure. Non-substituted region of mannan chain are associated, as in a solid state to form interchain junctions, while the substituted regions are highly hydrated, as in solution, and inhibit the complete precipitation. According to [89].*

Figure 12. A) courbe d'écoulement de concentrations croissantes en galactomannanes et B) spectre mécanique de solutions de galactomannanes de caroube, pris à 25 °C [75]. Avec l'autorisation d'Elsevier. *Figure 12: steady shear viscosity profiles of increasing galactomannans concentrations and B) mechanical spectrum of carob galactomannans solutions, measured at 25 °C [75]. With permission of Elsevier.*

Figure 13. origine moléculaire des interactions du xanthane avec les galactomannanes. Les zones de jonctions pourraient être formées par des associations coopératives entre des régions de la chaîne de mannane et la structure native du xanthane [84]. Avec l'autorisation d'Elsevier. *Figure 13: molecular origin of xanthan interactions with galactomannans. The junction zones could be formed by cooperative associations between parts of the mannan chain and xanthan native structure [84]. With permission of Elsevier.*

Figure 14. Modèle proposé pour l'association de xanthane et A) de gomme de caroube ; B) de galactomannane de *Leucaena leucocephala* [97]. Avec l'autorisation d'Elsevier. *Figure 14: Proposed model for the combination of xanthan and A) locust bean gum B) galactomannan of Leucaena leucocephala [97]. With permission of Elsevier.*

Chapitre 3 : L'hydrolyse en milieu high temperature water (HTW)

Figure 1. Densité, constante diélectrique statique et constante de dissociation ionique (K_w) de l'eau à 30 MPa, en fonction de la température. La constante diélectrique de l'eau chute de façon drastique lorsque la température augmente et se rapproche de celle d'un solvant non polaire dans des conditions supercritiques. D'après [2].

Figure 2. Voies de dégradation du D-glucose et du D-fructose. D'après [2].

Figure 3. Tracé d'Arrhenius (du premier ordre) des données de dégradation du glucose. D'après [2].

Chapitre 4 : Impact of purification and fractionation process on the chemical structure and physical properties of locust bean gum

Figure 1. Different theoretical kinds of galactosyl distributions proposed in the literature : (a) the regular arrangement, (b) the random arrangement, and (c) uniform layout of blocks (According to [3], with the permission from Elsevier).

Figure 2. Illustration of the purification and temperature fractionation process.

Figure 3. $[^{13}\text{C}]$ -NMR spectrum of different galactomannans: GM25, GM80, HCLBG and guar gum. Focus on mannosyl fourth carbon (C4).

Figure 4. Plausible schematic representation of GM25 and GM80 fractions structures. M and G are respectively mannosyl and galactosyl units.

Figure 5. A. Evolution of GM25 and GM80 solubility during dissolution time. Dissolution temperatures of 25 °C and 80 °C are shown respectively with dotted and continuous lines. B. Hardness (N) of galactomannan/xanthan (1:2) and galactomannans/carrageenan (1:2) gels generated at 80 °C (6 g/L). Comparison between GM25 and GM80 fractions.

Figure 6. A. Steady shear viscosity profile of GM25 and GM80 dispersions (1%). B. Mechanical spectra of GM25 and GM80 dispersions (1%).

Chapitre 5: Structure impact of two galactomannan fractions on their viscosity properties in dilute solution, unperturbed state and gel state

Figure 1. Schematic representation of GM25 and GM80 fractions structures. M and G are respectively mannosyl and galactosyl units. According to [4], with permission from Elsevier.

Figure 2. Huggins and Kraemer plots for GM25 and GM80 fractions in water.

Figure 3. Determination of the coil overlap parameter for both GM fractions. Standard deviations are too small to be observable on the graph.

Figure 4. Steady shear viscosity profile of GM25 (left) and GM80 (right) fractions at 0.5%, 1% and 2%.

Figure 5. Generalized shear-thinning curve for random coil polysaccharides (black spots) and comparisons to GM25 and GM80 fractions.

Figure 6. Steady shear viscosity profile of GM25 (left) and GM80 (right) fraction at 1% in alkaline medium, neutralized medium and salt water (25 °C).

Figure 7. Mechanical spectra of GM25 and GM80 fraction at different galactomannan contents in pure water (left) and salt water (right).

Chapitre 6: Structure impact of two galactomannan fractions on their degradation kinetics in high temperature water

Figure 1. Schematic representation of GM25 and GM80 fractions structure. M and G are respectively mannosyl and galactosyl units. According to [15], with permission from Elsevier.

Figure 2. HP-SEC measurements. Change in Mw of the GM25 and GM80 fractions during HTW hydrolysis, respectively at 170 °C (A) and 190 °C (B) and DP1-5 quantification for GM25 and GM80 fractions, respectively at 170 °C (C) and 190 °C (D).

Figure 3. Evolution over time of: A) Mannose concentration, for GM25 and GM80 fractions at 170 °C ; B) Galactose concentration, for GM25 and GM80 fractions at 170 °C ; C) Mannose concentration, for GM25 and GM80 fractions at 190 °C ; D) Galactose concentration, for GM25 and GM80 fractions at 190 °C.

Figure 4. Evolution of M/G ratios and polymerization rates for galactomannans polymerized residues during the hydrolysis time, for GM25 and GM80 fraction at : A) 170°C ; B) 190 °C.

Figure 5. Hexoses degradation products. Hydroxymethylfurfural (HMF) production from GM25 and GM80 fractions (%), respectively at 170 °C (A) and 190 °C (B); 2-furfural (2-F) production from GM25 and GM80 fractions (%), respectively at 170 °C (C) and 190 °C (D). Evolutions of the pH for GM25 and GM80 solutions during the HTW respectively at 170 °C (E) and 190 °C (F).

Figure 6. α and β bonds breaking. (A) probabilistic opportunities; (B) influence of the electronic environment.

Liste des tableaux

Chapitre 1 : Influence du procédé d'extraction et de purification sur les caractéristiques et les propriétés d'une gomme de caroube.

Tableau 1. Production de caroubes dans le monde et pour le bassin méditerranéen de 2000 à 2008 [10]. *Table 1. Locust bean production in the world and the Mediterranean from 2000 to 2008 [10].*

Tableau 2. Ratios Mannose/ Galactose des principales légumineuses utilisées industriellement. D'après [23, 24, 25]. *Table 2. Ratio mannose / galactose of the main Fabaceae used in industry. According to [23, 24, 25].*

Tableau 3. Composition chimique (en %) de la gomme de caroube brute et purifiée exprimée par rapport à la matière sèche. D'après [42, 44]. *Table 3. Chemical composition (%) relative to the dry matter of crude and purified locust bean gum. According to [42, 44].*

Chapitre 2 : La relation structure chimique-propriétés physiques des galactomannanes extraits de la caroube

Tableau 1. Impact de la température de purification/fractionnement sur la relation structure-fonction des galactomannanes de caroube (méthode soustractive).

Chapitre 4 : Impact of purification and fractionation process on the chemical structure and physical properties of locust bean gum

Table 1. Production yields of GM25 and GM80 fractions (as % of initial dry matter) and their chemical characterization.

Table 2. Fine structural characterization of different galactomannans: GM25, GM80, HCLBG and guar gum (Guar).

Table 3. Structural data of GM25 and GM80 solutions (0.5 mg/mL) determined at 40 °C by SEC-MALLS : weight average molecular weight (Mw), number average molecular weight (Mn), polydispersity index (PI), radius of gyration (Rg).

Chapitre 5: Structure impact of two galactomannan fractions on their viscosity properties in dilute solution, unperturbed state and gel state

Table 1. Values of GM25 and GM80 (i) based on measurements and (ii) calculated using different models proposed by other authors.

Table 2. Values of M_w , M/G , $[\eta]$, $C[\eta]$ and α for galactomannans found in literature.

Table 3. Zero-shear viscosity (η_0) and shear rate at which viscosity is reduced to $\eta_0/2$ ($\dot{\gamma}_{1/2}$) for GM25 and GM80 fraction at different concentrations in pure water at 25 °C.

Table 4. Main textural parameters obtained from TPA on different galactomannan dispersion/hydrogels.

Liste des abréviations et symboles

2-F	2-furaldehyde
5-HMF	5-hydroxymethylfurfural
ADF	acid-detergent fiber method
α	Mark-Houwink exponent
c, C	concentration
c^* , C^*	critical concentration
c^{**} , C^{**}	concentrated regime concentration
$^{\circ}\text{C}$	Degree Celsius
^{13}C	carbon 13
$C[\eta]$	coil overlap parameter
CLBG	crude locust bean gum
cp	centipoise
CWS	cold water solution
Da	Dalton
DHB	dihydroxybenzoic acid
dL	deciliter
DMSO	dimethylsulfoxide
dn/dc	refractive index increment
DP	degree of polymerization
DS_{Gal}	Degree of substitution in galactosyl
DSS	4,4-dimethyl-4-silapentane-1-sulfonic acid
E410	locust bean gum
F_{11} , F_{21} , F_{12} , F_{22}	diad frequencies
FID	flame ionization detector
Φ_F	Flory-fox constant
g	gram
g	gravitational force
G'	elastic modulus, storage modulus
G''	viscous modulus, loss modulus
GC	gas chromatography
GC-MS	gas chromatography coupled with mass spectrometry
GM	galactomannans
GM25	fraction of LBG galactomannans solubilized at 25 $^{\circ}\text{C}$

GM80	fraction of LBG galactomannans solubilized at 80 °C
γ	shear rate
$\gamma_{1/2}$	shear rate with $\eta = \eta_0/2$
h	hour
HCLBG	hydrolyzed crude locust bean gum
HCW	hot compressed water
HPLC	high performance liquid chromatography
HP-SEC	high performance – size exclusion chromatography
HTW	high temperature water
HWS	hot water solution
Hz	hertz
η	dynamic viscosity
η^*	complex viscosity
$[\eta]$	intrinsic viscosity
η_{sp}	specific viscosity
η_s	solution viscosity
η_0	solvent viscosity
η_0	zero-shear viscosity
I	intensity
K	consistency parameter
K	Mark-Houwink coefficient
k	kilo
kV	kilovolt
L	liter
LBG	locust bean gum
λ_H	Huggins constant
λ_K	Kraemer constant
m	meter
M	molar
MALDI-TOF	matrix assisted laser desorption ionisation - time of flight
MALLS	multi-angle laser light scattering
MHz	megahertz
mL	mililiter
mM	milimolar
mm	milimeter
M/G	manosyl/galactosyl ratio
Mw	weight average molecular weight

Mn	number average molecular weight
mol	mole
MOS	manno-oligosaccharides
μL	microliter
μm	micrometre
n	flow index
N	newton
nL	nanoliter
nm	nanometre
NMR	nuclear magnetic resonance
P	pressure
Pa	pascal
pH	potential of hydrogen
PI	polydispersity index
R ²	correlation coefficient
rf	radio-frequency
R _g	radius of gyration
RI	refractive index
RMN	Nuclear magnetic resonance
RP	residual pellet
rpm	rotation per minute
s	second
SEC	size exclusion chromatography
T	temperature
THF	trifluoroacetic acid
T _m	conformational transition temperature
TMA	thermomechanical analysis
TPA	texture profile analysis
τ	shear stress
τ ₀	yield stress
U	unit
UV	ultra-violet
v/v	volumes ratio
w/v	weight/volume ratio
X _{Gal}	galactosyl molar fraction

1

Introduction, objectifs et stratégie

Le caroubier est une essence cultivée essentiellement dans le bassin méditerranéen et qui produit des caroubes. La production mondiale de caroube a connu un déclin ces dix dernières années et se situait en 2016 aux alentours de 160 kT (Source F.A.O.). La gomme extraite de la caroube est un agent texturant extrait de la graine du caroubier. Elle est principalement utilisée dans l'industrie agro-alimentaire pour les propriétés rhéologiques qu'elle peut conférer à des formulations. A côté de ses propriétés physiques, la gomme de caroube est également susceptible de cibler des marchés à plus haute valeur ajoutée où ses propriétés chimiques ou biologiques pourraient se révéler intéressantes (cas des prébiotiques). De par sa composition structurale, la gomme de caroube est également proche de certaines hémicelluloses retrouvées dans la biomasse et ciblées comme sources de molécules plateforme. Elle constitue dès lors une fibre modèle qui présente l'avantage de ne pas être enfermée dans le réseau lignocellulosique (pas de dégradation à l'extraction), et à laquelle il peut être judicieux de s'intéresser (comprendre sa réactivité), même dans une optique de bioraffinage (bien qu'elle ne constituera jamais la matière première d'une telle industrie).

Jusqu'à présent, les applications de la gomme de caroube se sont principalement basées sur une approche empirique. Certains auteurs se sont toutefois intéressés aux liens entre certaines caractéristiques des galactomannanes et leurs propriétés. L'état des connaissances sur le sujet restait cependant lacunaire.

L'objectif de ce travail de recherche doctorale est double :

- Réaliser l'état des lieux des connaissances publiées dans le domaine de la relation structure-fonction des galactomannanes, et le structurer de manière à identifier les zones d'ombres résiduelles de cette thématique abondamment publiée.
- Sur base des constats précédents, définir une stratégie expérimentale permettant d'apporter des éléments de réponses supplémentaires aidant à mieux comprendre l'impact de la structure des galactomannanes sur les propriétés réactionnelles ou physicochimiques développées en solutions aqueuses.

Afin de répondre au second objectif et de traiter la thématique, la stratégie expérimentale retenue a consisté à extraire, de façon soustractive et à deux

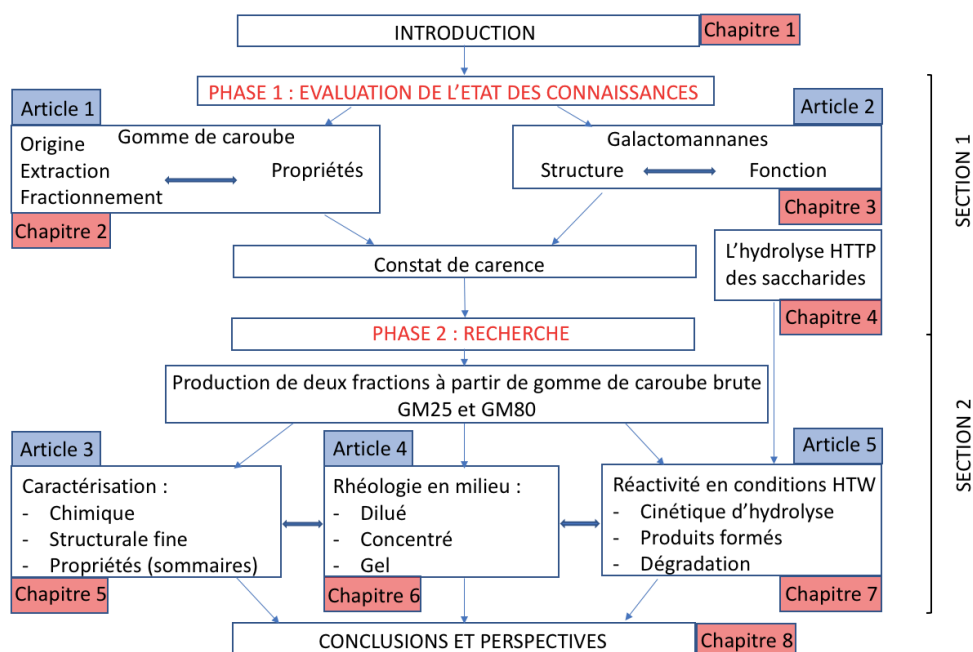
températures différentes, deux fractions de galactomannanes à partir de gomme de caroube brute. Des températures de travail de 25°C et 80°C ont été retenues – en se basant sur des travaux préexistants – pour leurs écarts importants, susceptibles de générer des extraits contrastés. Les fractions obtenues (respectivement GM25 et GM80) sur base de solubilités différentes ont ensuite été caractérisées structurellement afin de mettre en évidence leurs différences. Le comportement de ces fractions en solution aqueuse a ensuite été étudié du point de vue de la rhéologie, sur une large gamme de concentrations (régime dilué, concentré et état gel) et mis en relation avec leurs structures. Dans un second temps, la réactivité des fractions et leurs cinétiques d'hydrolyse en conditions de hautes températures et pressions ont également été investiguées, en lien avec leurs structures également. Les différentes observations qui ont découlé du travail d'analyse ont enfin été discutées de façon intégrée et globale.

Ce document, qui présente l'ensemble des informations obtenues et analysées sous forme d'une thèse à articles, a été scindé en deux parties distinctes.

La première section qui précise l'état des lieux des connaissances sur le sujet est structurée en trois chapitres correspondant pour les deux premiers à un article. Le premier chapitre porte sur l'étude bibliographique de l'influence du procédé d'extraction et de purification sur les caractéristiques et les propriétés de la gomme de caroube. Le second chapitre synthétise l'information disponible sur la relation existant entre la structure chimique et les propriétés physiques des galactomannanes extraits de la caroube. Le troisième chapitre présente brièvement l'hydrolyse des polysaccharides dans un milieu aqueux à hautes température et pression, des conditions qui seront utilisées par la suite pour étudier les cinétiques d'hydrolyse de galactomannanes de structures différentes. Ces trois premiers chapitres ont été rédigés en français (au même titre que l'introduction et la conclusion) pour faciliter la lecture et la compréhension de cette thématique complexe et dense.

La seconde section est consacrée exclusivement à la présentation des résultats obtenus lors du travail d'expérimentations et de recherches doctorales. A nouveau, la section a été structurée sous forme de trois chapitres correspondant chacun à un article. Ceux-ci ont été repris tels quels en anglais. Le premier chapitre de la seconde section vise à étudier l'impact de la purification et d'un procédé de fractionnement sur la structure chimique et les propriétés physiques de la gomme de caroube. Plus spécifiquement, la structure chimique fine de deux fractions de galactomannanes sera déterminée précisément et mise en relation avec quelques mesures de comportement rhéologique. Le second chapitre dressera une étude rhéologique complète des deux fractions présentées au premier chapitre et dont la structure fine

Les deux sections du document sont ponctuées de conclusions générales dont la but est d'établir des ponts entre les différents angles d'attaque utilisés pour étudier la thématique et ainsi d'en dresser un portrait plus global.



SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

2

Influence du procédé d'extraction et de purification sur les caractéristiques et les propriétés d'une gomme de caroube

Gillet, S., Simon, M., Paquot, M., & Richel, A. (2014). Synthèse bibliographique de l'influence du procédé d'extraction et de purification sur les caractéristiques et les propriétés d'une gomme de caroube. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement* = *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, 18(1).

Note introductive

Le caroubier est une espèce cultivée dans le bassin méditerranéen, pour la récolte de ses grains. Celles-ci contiennent un endosperme riche en galactomannanes qui sert de matière première de base dans la fabrication de gomme de caroube. La gomme est utilisée notamment dans l'industrie agro-alimentaire pour ses propriétés texturantes.

L'objectif de cette synthèse bibliographique est de présenter la situation globale de la caroube. Sa culture, la composition botanique de la graine et la composition chimique des différents constituants y sont d'abord décrites. Le processus industriel d'obtention de la farine (gomme) de caroube y est ensuite détaillé, au même titre que sa purification. Plus spécifiquement, l'impact de celle-ci sur diverses propriétés de la gomme y est abordé.

De cette synthèse découle le choix stratégique, qui sera opéré dans la section expérimentale, de fractionner la gomme brute en deux fractions distinctes sur base de la température.

1.	Abstract.....	28
2.	Le caroubier	28
3.	La composition de la caroube	30
4.	Extraction, purification et composition de la gomme.....	34
5.	Influence de la purification sur les propriétés de la gomme	39
5.1.	La solubilisation.....	39
5.2.	Le fractionnement	42
5.3.	La relation structure-fonction	43
6.	Conclusions.....	44
7.	Références Bibliographiques	45

1. Abstract

The carob tree is a species cultivated, in mediterranean countries, for its seeds. These seeds contain an endosperm rich in galactomannans used by the food industry for its texturing properties. After harvesting, the seeds pass through a decutilation and a degermination. Cleaned endosperms are then milled to give crude locust bean gum. The purification step consists in a flour solubilization and then a precipitation of the galactomannans. Purification influences the characteristics of the resulting gum. The solubilization temperature is the parameter that affects the most on the final characteristics of the product. If it is hot or cold, galactomannans with different structural characteristics (and thus very different physical properties in aqueous solutions) will be selected.

1. Le caroubier

Le caroubier ou *Ceratonia siliqua* L., de la famille des *Caesalpiniaceae*, est un arbuste dioïque à feuilles persistantes et de croissance lente [1, 2]. C'est une essence thermophile cultivée en climat méditerranéen, mais originaire des pays arabes [3]. On le retrouve dans la région méditerranéenne, principalement en Espagne, en Italie, en Grèce, au Portugal et au Maroc [1, 4]. Le caroubier présente une bonne résistance à la sécheresse mais est sensible au froid [1]. Il peut atteindre une taille allant de 8 à 15 mètres et vivre jusqu'à 500 ans. Cette essence est souvent utilisée pour lutter contre la déforestation et la désertification, en limitant l'érosion des sols [5]. Les petites fleurs rouges du caroubier, fleurissent à partir de septembre jusqu'au mois de novembre [6]. Ce sont elles qui, après fécondation, vont donner naissance aux fruits appelés gousses. Celles-ci contiennent les graines de caroube qui sont utilisées pour produire de la gomme de caroube. Cet additif est fort recherché dans l'industrie agroalimentaire – notamment pour ses propriétés texturantes [7] – ainsi que dans le secteur pharmaceutique [8]. En termes de surface cultivée, la culture du caroubier représente un peu plus de 100 000 hectares (102 939 hectares en 2008) à travers le monde. L'Espagne, le Maroc et le Portugal possèdent les surfaces cultivées les plus importantes, de l'ordre de 60 000, 12 000 et 10 000 hectares respectivement. Le Tableau 1 présente la production de caroubes dans le monde et pour le bassin méditerranéen de ces dernières années. On estime à plus de 15 000 tonnes la production mondiale annuelle de gomme de caroube [9].

Tableau 1. Production de caroubes dans le monde et pour le bassin méditerranéen de 2000 à 2008 [10]. *Table 1. Locust bean production in the world and the Mediterranean from 2000 to 2008 [10].*

	Production (tonnes)								
Pays	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008
Espagne	93863	73211	74736	67403	79200	64100	70000	72000	72000
Italie	38079	16282	24015	18637	19060	31665	26110	32784	31224
Grèce	20192	16464	15015	14789	14594	14815	14506	15000	15000
Maroc	23000	24000	24000	25000	25000	25000	25000	25000	25000
Portugal	20000	20000	20000	20000	20000	20000	22000	23000	23000
Turquie	14000	13500	13500	14000	14000	12000	12388	12161	12100
Chypre	7300	2850	7200	6550	6250	6942	5650	3839	3915
Monde	226829	177787	188070	174365	186595	181830	184115	193250	191167

2. La composition de la caroube

La gousse du caroubier, nommée caroube, est une gousse indéhiscente de 10 à 30 cm de longueur sur quelques centimètres de largeur. A maturité, la caroube change de couleur et devient brune. Ses composants majeurs sont la pulpe et les graines [11], contenues dans les logettes de la gousse.

La composition de la pulpe de caroube dépend de la variété, du climat et des techniques de cultures. Toutefois, on peut avancer que la pulpe de caroube représente 90% de la masse du fruit. Elle est riche en tanins et en sucres, dont le saccharose représente 65 à 75% des sucres totaux. Les taux de protéines et de lipides sont faibles [3]. Les principales applications de la pulpe de caroube sont l'alimentation animale et humaine en tant que substitut du cacao [1]. Elle présente l'avantage d'être exempte de théobromine et de caféine contrairement au cacao qui en contient des quantités importantes [12]. Dans de nombreux pays arabes, une boisson consommée lors du Ramadan est fabriquée à partir de caroube [12]. La pulpe de caroube est souvent consommée sous forme de poudre [13]. Dans les pays occidentaux, celle-ci est produite par égrenage, concassage, broyage et torréfaction des gousses de caroube [12].

Les graines constituent environ 10% de la masse de la gousse (caroube) [3, 2]. Leur nombre varie généralement entre 10 et 15. Les graines de caroube ont longtemps été employées comme unité de mesure des diamants et des pierres précieuses, un carat correspondant à la masse d'une graine de caroube soit environ 200 mg [6].

Les graines de caroube (Figure 1) sont constituées de trois éléments : les téguments, la radicule et l'endosperme. Les téguments sont une enveloppe résistante de couleur brune [13, 4]. Cette coque représente 30 à 35 % du poids sec de la graine [14]. Au centre de la graine se trouve une radicule (ou embryon). Elle représente entre 15 et 30 % du poids sec de la graine [14]. Celle-ci possède une valeur énergétique élevée due à son taux important de protéines principalement solubles dans l'eau et de lipides majoritairement insaturés. Elle est employée pour la nutrition du bétail et comme aliment diététique [15]. La radicule contient également un certain nombre d'enzymes susceptibles de s'attaquer à l'endosperme lors, par

exemple, d'un processus de germination [15] : les endo-1,4- β -mannanases, les α -galactosidases, les β -mannosidases.

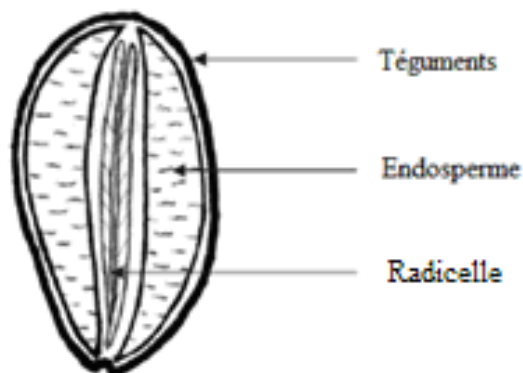


Figure 1. Coupe transversale d'une graine de caroube. D'après Dakia et al., 2008. *Cross section in a carob seed. According to [4].*

L'endosperme se trouve entre les téguments et la radicelle. Il représente 40 à 50 % du poids de la graine et constitue la matière de base utilisée dans la fabrication de la gomme de caroube [14]. Il s'agit de polysaccharides de réserve que l'on retrouve dans l'endosperme translucide de nombreuses graines de plantes légumineuses dont celles de caroube. Ces polysaccharides sont appelés galactomannanes [16]. Les galactomannanes sont des hémicelluloses présentes dans le règne végétal. Ils sont produits en quantités variables notamment dans l'endosperme d'une grande proportion des graines de légumineuses [17]. Leur fonction est de servir de réserve de nourriture à l'embryon lors de la germination. Les galactomannanes sont constitués d'une chaîne principale de résidus D-mannopyranoses liés en β -(1 \rightarrow 4) sur laquelle se greffent des résidus D-galactopyranoses uniques grâce à une liaison de type α -(1 \rightarrow 6) (Figure 2) [18, 19]. Le rapport mannose/galactose des galactomannanes et la distribution des résidus galactose le long de la chaîne de mannose sont spécifiques de l'espèce végétale [20]. Ces deux éléments, ainsi que la longueur des chaînes, vont permettre d'établir une distinction entre les différents types de galactomannanes.

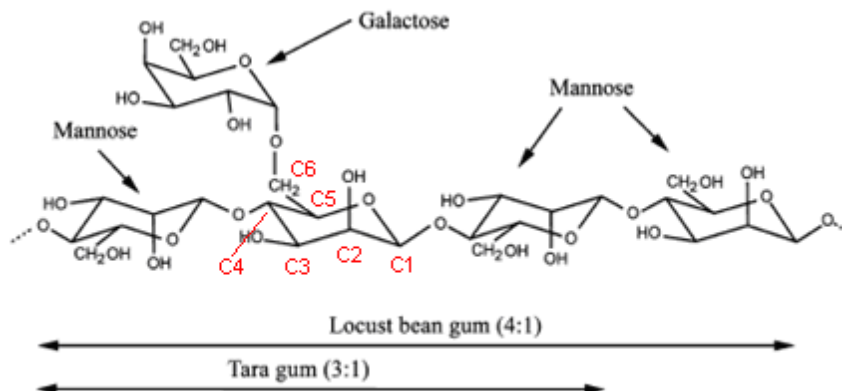


Figure 2. Structure des galactomannanes de la gomme de caroube et de la gomme tara.
D'après [21]. *Locust bean gum and tara gum galactomannan's structure. According to [21].*

Le rapport mannose/galactose (M/G) est généralement déterminé par une hydrolyse acide des galactomannanes suivie d'une dérivatisation des monosaccharides obtenus, en acétates d'alditols [22]. Les dérivés sont ensuite analysés en chromatographie en phase gazeuse. Le rapport M/G peut varier de 10 à 1 en fonction de l'espèce végétale [15]. Les galactomannanes de caroube possèdent un M/G de 4, alors que pour la gomme de guar et la gomme tara – deux autres gommes commercialement importantes – il est de 2 et 3 respectivement (Tableau 2) [23]. On utilise également dans la littérature le degré de substitution en galactose (DS_{Gal}) à la place du rapport M/G. Il correspond à la masse de galactose divisée par la masse de mannose ($DS_{Gal} = G/M = 1/(\text{ratio M/G})$). Le rapport M/G d'un galactomannane peut varier au sein des galactomannanes de caroube. Il est dépendant des conditions climatiques, de la composition du sol, de la variété de l'âge de l'arbre [9] et des conditions de culture [2].

Tableau 2. Ratios Mannose/ Galactose des principales légumineuses utilisées industriellement. D'après [23, 24, 25]. *Table 2. Ratio mannose / galactose of the main Fabaceae used in industry. According to [23, 24, 25].*

Source	Ratio Man/Gal	Référence
<i>Schizolobium parahybum</i>	3 : 1	Bresolin <i>et al.</i> , 1997
<i>Mimosa scrabella</i>	1,1 : 1	Bresolin <i>et al.</i> , 1997
<i>Cyamopsis tetragonoloba</i> (gomme de guar)	2 : 1	Parvathy <i>et al.</i> , 2005
<i>Caesalpinia spinosa</i> (gomme tara)	3 : 1	Parvathy <i>et al.</i> , 2005
<i>Ceratonia siliqua</i> (gomme de caroube)	4 : 1	Parvathy <i>et al.</i> , 2005
<i>Trigonella foenum-graecum</i> (gomme de fenugrec)	1 : 1	Garti <i>et al.</i> , 1997

Plus que le rapport M/G, la répartition des unités galactose va influencer considérablement les propriétés des galactomannanes en solution aqueuse. Différents types de répartition, existant dans la nature, ont été proposés dans la littérature : la disposition régulière, la disposition aléatoire et la disposition en blocs uniformes (Figure 3). Des intermédiaires entre ces trois structures « types » peuvent également exister [15]. Des études complémentaires ont permis de définir plus précisément la structure des galactomannanes de caroube. Celles-ci ont été réalisées par dégradation alcaline [26], par oxydation au periodate [27], par résonance magnétique nucléaire du ^{13}C [28, 29, 30], ainsi que par hydrolyse enzymatique suivie d'une simulation par ordinateur [31, 32, 16]. Sur base de ces résultats, il apparaît que la structure fine des galactomannanes de caroube serait constituée de zones « lisses » faiblement substituées et de zones « hérissées » beaucoup plus denses en galactose latéraux, sans pour autant qu'ils soient systématiquement adjacents.

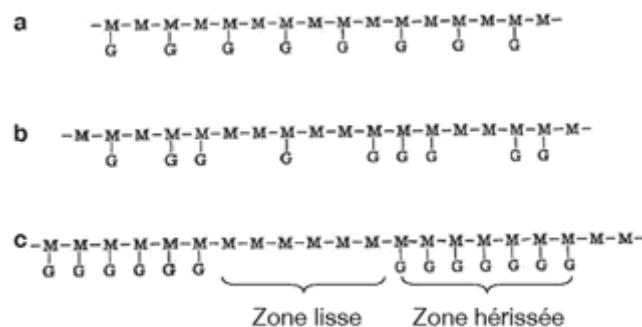


Figure 3. Distribution des résidus galactoses sur la chaîne de mannoses. D'après [15]. (a) répartition régulière, (b) répartition aléatoire, (c) répartition en blocs uniformes. *Galactose distribution along the main chain of mannose. According to [15]. (a) regular arrangement, (b) random distribution, (c) distribution in uniform blocks.*

La masse moléculaire est également un élément important à prendre en compte dans la caractérisation de la structure moléculaire d'un polysaccharide. Elle est en effet susceptible de modifier les propriétés physiques du polymère en solution. Les galactomannanes, comme beaucoup d'autres polysaccharides naturels, ont tendance à être polydispersés, et par conséquent, sont décrits par une masse moléculaire moyenne [15, 33]. La masse moléculaire moyenne en nombre (M_n) reprise généralement dans la littérature est située aux environs de 300 000 Daltons [34, 15].

3. Extraction, purification et composition de la gomme

Les galactomannanes de caroube sont fort recherchés par l'industrie alimentaire pour leurs propriétés texturantes. Dans ce but, l'endosperme de la graine de caroube peut être extrait et broyé pour donner naissance à une poudre blanche commercialisée sous le nom de « gomme de caroube ». Le procédé d'extraction utilisé doit veiller à ne pas dégrader les galactomannanes afin que leurs propriétés technofonctionnelles demeurent intactes, tout en garantissant une certaine pureté à la gomme obtenue. Les enzymes résiduelles doivent également être dénaturées afin de ne pas hydrolyser les galactomannanes lors de leur mise en solution aqueuse.

Les détails des techniques d'extraction et d'autres traitements de la gomme de caroube sont relativement confidentiels. On sait toutefois que les procédés d'extraction classique des gommés naturelles ne peuvent être appliqués à la caroube à cause de l'extrême dureté de ses graines [35, 36]. Un procédé industriel général d'extraction et de purification adapté à la gomme de caroube à partir des gousses et plus spécifiquement des graines de caroube est proposé à la Figure 4. Il comporte plusieurs grandes étapes.

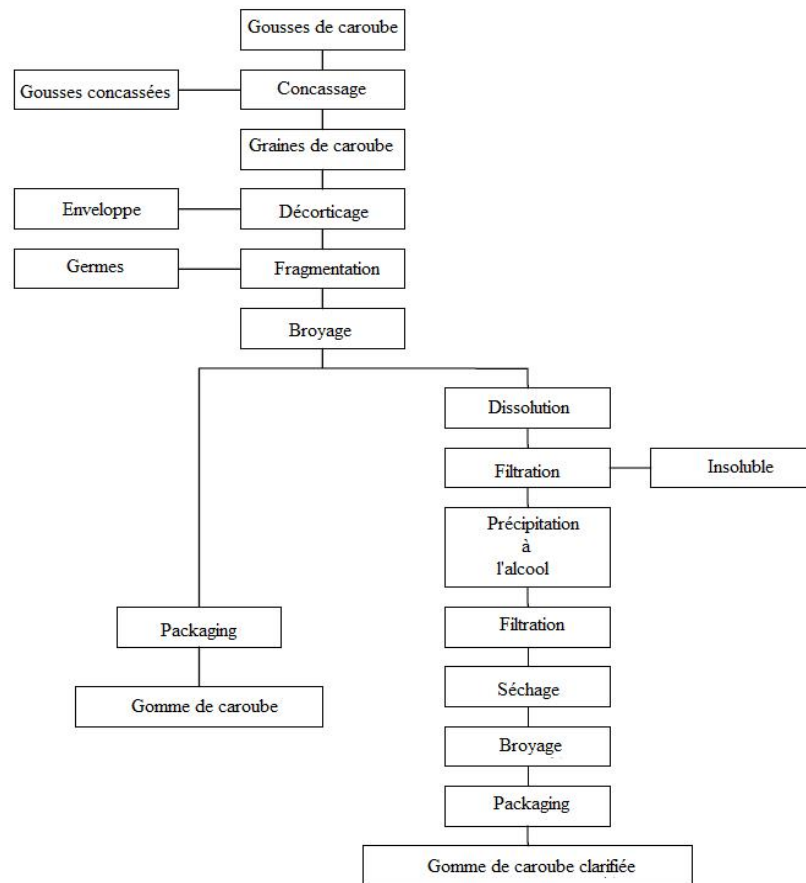


Figure 4. Schéma du processus d'extraction et de purification de la gomme de caroube. D'après [37]. *Process of extraction and solubilisation of the locust bean gum. According to [37].*

Etape 1 : la séparation des graines

Dans un procédé classique, les cosses sont laissées à sécher pendant environ un mois. Elles sont ensuite écrasées dans les machines d'égrenage, qui sont habituellement des broyeurs à marteaux. Ces broyeurs-concasseurs sont assortis d'une série de tamis qui trient les morceaux cassés selon la taille. Les graines sont encore séparées des morceaux de cosses de même taille en soufflant de l'air dans le mélange [6].

Etape 2 : l'élimination des téguments

Une fois les graines récoltées, la séparation de l'endosperme constitue le traitement primaire de la production de gomme. Les principes de base du processus sont une décortication et une dégermination. La mise en œuvre d'un tel protocole est difficile en raison de la solidité et de la dureté des téguments. Le processus de décortication consiste à enlever les téguments. Pour ce faire, quatre techniques principales peuvent être utilisées : un traitement physique, un traitement chimique, un traitement mécanique et un traitement par trempage.

Le traitement chimique consiste à carboniser les enveloppes coriaces à l'aide d'un traitement à l'acide sulfurique [38]. Un lavage et un brossage permettent l'élimination des fragments restants. Ce processus permet l'obtention d'une gomme de caroube blanche et de haute viscosité [37]. Toutefois, ce traitement entame et altère partiellement l'endosperme dans ses caractéristiques physiques et chimiques [6]. Le procédé physique repose sur l'éclatement plus ou moins complet de l'enveloppe par rôissage (100°C). Celle-ci se détache ensuite facilement du reste de la graine dans des machines abrasives [38]. [12] recommandent un rôissage de 60 minutes à 150 °C pour obtenir une gomme de bonne qualité. La gomme de caroube obtenue par rôissage est toutefois un peu plus foncée [37]. Les hautes températures altèrent cependant l'endosperme ainsi que l'embryon et entraînent une séparation difficile des constituants. Le traitement mécanique va séparer la coque du mucilage de la graine, en passant ces dernières à travers des broyeurs à marteaux ou autre décortiqueuse et appareil dégermeur. Dans ce cas, il est possible d'obtenir des mucilages purs et intacts, en empêchant les fractions de coques et de germes de se retrouver mélangées à l'endosperme [6]. Une autre technique consiste à soumettre des graines entières ou en morceaux à un trempage dans une solution aqueuse puis à une congélation [39]. La congélation du liquide absorbé augmente le volume des

graines, entraînant un détachement substantiel des différents constituants à tel point que la coque et l'embryon sont facilement enlevés par passage dans un séparateur mécanique.

Etape 3 : la dégermination

L'étape suivante consistera en l'élimination du germe. Celui-ci est écrasé par broyage mécanique et éliminé principalement par tamisage. Il ne reste alors plus que les endospermes qui sont broyés en fines particules pour obtenir la gomme de caroube [40].

Les rendements en endospermes, moulus et transformés en gomme de caroube, sont extrêmement variables et dépendent tant du procédé d'extraction utilisé que du cultivar ou des conditions de climat et de sol lors de la culture du caroubier [15]. Généralement, il avoisine les 70% en masse. Les contaminants principaux de cette méthode sont les arabinoxylanes, présents à moins de 3%. Il est possible de les éliminer enzymatiquement [6]. Des protéines sont également présentes à raison de 2%. La dégradation enzymatique des protéines est aussi utilisée pour la purification des galactomannanes. [41] ont utilisé la pronase pour réduire la teneur en protéine de 2,36% à 0,57% de la gomme de fenugrec, proche de la caroube. La gomme de caroube subit parfois des traitements industriels ultérieurs dans lesquels elle est modifiée chimiquement, physiquement ou mélangée à d'autres gommages pour donner un produit final avec des propriétés physiques et fonctionnelles améliorées ou une solubilité accrue [6].

Etape 4 : la clarification

Des traitements de purification (appelés également clarification) ont ensuite lieu dans le but d'éliminer les odeurs de la farine brute, les impuretés et les enzymes endogènes [42]. Pour ce faire, la gomme de caroube subit une clarification. Celle-ci réside en une solubilisation dans l'eau [37]. Parfois des solutions de soude diluées ou d'acide acétique à 1% sont utilisées [15]. Plus la température de solubilisation est élevée plus la matière en solution est importante. Le rendement de purification sera donc amélioré en augmentant la température. Le matériel insoluble est ensuite éliminé à l'aide d'une étape de filtration [37] ou de centrifugation [15].

Enfin, la gomme de caroube est précipitée soit à l'aide d'un non-solvant du polysaccharide (miscible à l'eau), soit par formation de complexes métalliques. Le précipité est récupéré par filtration, séché et broyé en fines particules. Cette dernière opération peut être répétée plusieurs fois selon le degré de pureté attendu [15]. La gomme de caroube obtenue est dite clarifiée (extraite et purifiée) [37].

La précipitation à l'éthanol est la plus largement utilisée [17]. La purification par précipitation à l'*isopropanol* qui est peu utilisée dans les laboratoires est une méthode de choix en génie des procédés industriels [15, 36, 43, 44]. La précipitation au méthanol existe également [45]. Certains auteurs utilisent également la précipitation à l'aide des complexes de cuivre [17, 46] ou de baryum [47]. Dans ces complexes les ions cuivre et baryum établissent des interactions entre les groupes *cis*-hydroxyles des résidus de mannose [42]. Toutefois, les plus faibles masses moléculaires observées lors de ce type de purification pourraient s'expliquer par un clivage des chaînes de molécules de la gomme. Cela aura un impact évident sur les propriétés finales du produit [15]. De plus, cette méthode ne permet pas d'éliminer les arabinoxylanes, car ils précipitent [6]. Il existe enfin une précipitation dans du tampon borate à l'aide de bromure de cetyltriméthylammonium (cetavlon). Ici également, le groupement hydroxyle en position *cis* est essentiel pour la précipitation [42].

Les compositions de gommes de caroube brutes et clarifiées ont été investiguées par certains auteurs [36, 42, 44]. Il ressort de leurs résultats (tableau 3) que la gomme de caroube est principalement composée de galactomannanes (environ 93%, déterminés par différence gravimétrique), de protéines (environ 4-5%), de lipides (1%) et de minéraux (1%). La purification permet d'éliminer la cellulose, la lignine et les lipides, ainsi que de diminuer considérablement les quantités de minéraux et de protéines [42].

Tableau 3. Composition chimique (en %) de la gomme de caroube brute et purifiée exprimée par rapport à la matière sèche. D'après [42, 44]. *Table 3. Chemical composition (%) relative to the dry matter of crude and purified locust bean gum. According to [42, 44].*

	Lopez da Silva & Gonçalves, 1990		Andrade <i>et al.</i> 1999	
	LBG brute	LBG purifiée	LBG brute	LBG purifiée
Cendres	0,71 ± 0,01	0,25 ± 0,01	0,95	0,28
Protéines	4,66 ± 0,33	0,78 ± 0,01	4,64	0,64
Lipides	0,92 ± 0,08	traces	n.d	n.d
Cellulose et lignine	1,55 ± 0,08	0,19 ± 0,04	n.d	n.d
Galactomannanes	92,2	98,8	94,4	99,1
TOTAL	100	100	100	100
% Matière Sèche	91,51 ± 0,03	87,3 ± 0,03	88,7	92,5

4. Influence de la purification sur les propriétés de la gomme

4.1. La solubilisation

Le point crucial du processus de clarification se situe lors des étapes de filtration ou de centrifugation. C'est à ce niveau que les matériaux solubles et insolubles seront séparés. La solubilité est donc le facteur clé qui permettra de sélectionner, ou non, des galactomannanes de caractéristiques données qui génèreront des gommages aux propriétés et aux applications différentes.

La solubilité de la gomme de caroube n'est pas liée à une quelconque fusion de zones cristallines [30]. D'après [48], la dissolution correspond principalement à une extraction polymère-solvant. Elle peut ainsi être représentée par le partitionnement

thermodynamique des chaînes de polymères entre la phase solide amorphe du polymère, gonflée par le solvant, et la phase de solvant pure environnante. La solubilité des galactomannanes est liée aux caractéristiques structurales de la gomme de caroube. Le degré de substitution en galactose (DS_{Gal}) et la masse moléculaire (M_w) sont les principaux paramètres dont l'influence a été étudiée [33, 49], mais la distribution des galactose le long de la chaîne semble également impacter la mise en solution.

Sans les groupements latéraux présents à une certaine concentration, le polysaccharide isolé est instable en solution et va cristalliser ou précipiter [49]. En réalité, les zones non substituées en galactose des galactomannanes sont le siège d'interactions intra- et inter-moléculaires générées par la présence de ponts hydrogène entre ces zones conduisant, dans les cas extrêmes, à l'agrégation et à la précipitation [41]. Les galactomannanes avec un rapport M/G généralement en dessous de 2,5 tels que la gomme de guar (2) ou de fenugrec (1,1) sont considérés comme solubles dans des solutions aqueuses diluées ou semi-diluées et thermodynamiquement stables. Plus le degré de substitution en galactose est élevé, plus la solubilité dans l'eau des galactomannanes est augmentée. Pour certains auteurs, les résidus galactopyranoses représentent donc les parties hydrophiles du galactomannane [19, 50]. Ils pourraient cependant également empêcher la formation de liaison coopérative entre les segments de mannoses libres. Les galactomannanes de rapport M/G intermédiaires à élevés ($> 2,5$) sont constitués de chaînes qui affichent une solubilité partielle dépendant de la valeur exacte du rapport M/G [33]. Les galactomannanes de caroube font partie de cette dernière catégorie et sont généralement considérés comme partiellement solubles [51]. Certains constituants se dissolvent donc directement dans de l'eau froide, mais une dissolution totale accompagnée d'une viscosité importante nécessitent une haute température et un long trempage [33] ou une forte agitation [50].

La température de solubilisation, lors de la clarification, va donc influencer considérablement les caractéristiques de la gomme, en sélectionnant des galactomannanes plus ou moins riches en galactose.

D'après Pollard *et al.*, 2007 approximativement la moitié – en masse – d'un échantillon de gomme de caroube brute est soluble à 5°C, les autres constituants se solubilisent progressivement avec l'augmentation de la température. Plusieurs études montrent ainsi que le DS_{Gal} est inversement lié aux températures de fractionnement et de solubilisation (Figure 5). Les fractions solubilisées à des températures de plus en plus hautes contiennent de moins en moins de galactose [32,

52, 53]. A l'inverse, les fractions solubles à froid sont donc celles qui contiennent le plus de galactose [49].

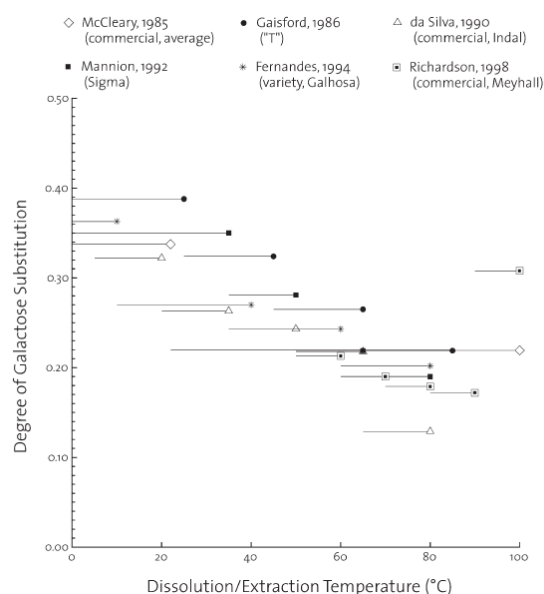


Figure 5. Composition moyenne en monomère de fractions de galactomannanes obtenues sur une large variété de source de gomme de caroube, parfois par fractionnement de solubilité [33]. Avec l'autorisation d'Esevier. *Average composition in monomer of galactomannan's fractions, obtained from a wide variety of source of locust bean gum, sometimes fractionated by solubility [33]. With permission from Elsevier.*

[49] ont également constaté une tendance à obtenir de plus hauts poids moléculaires (M_w) lorsque la température de dissolution augmente, tel que mis en évidence par chromatographie d'exclusion stérique couplée à une triple détection (Figure 6). Les composants polysaccharidiques qui se dissolvent avec une augmentation progressive de la température possèdent des chaînes de plus en plus longues, de l'ordre de 1 000 000 daltons. Ils fournissent donc une contribution positive la masse moléculaire globale. Par conséquent, une gamme assez large de valeurs peut être observée, dans le même matériel, selon la température de dissolution [49].

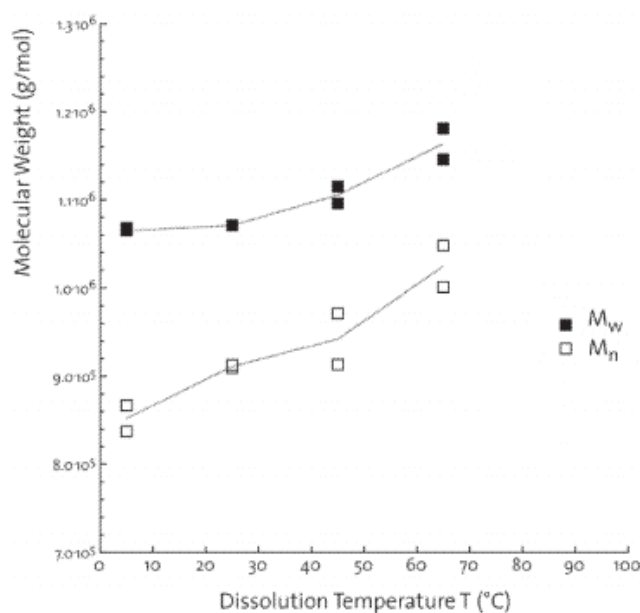


Figure 6. Masse moléculaire (déterminé par SEC) de fractions de gomme de caroube commerciale, solubilisée entre 5 °C et 65 °C [48]. Avec l'autorisation d'Elsevier. *Molecular weight (determined by SEC) of commercial locust bean gum fractions solubilized between 5 °C and 65 °C [48]. With permission from Elsevier.*

4.2. Le fractionnement

Dès lors, les propriétés de solubilité de la gomme de caroube sont également utilisées pour la séparer en fractions de structures fines différentes (DS_{Gal} et M_w différents) [28, 33, 52]. Deux techniques de fractionnement existent. La première se réalise de la même manière que l'étape de clarification d'un procédé industriel de purification de la gomme de caroube. La farine brute d'endosperme de caroube est dissoute à des températures données et rigoureusement contrôlées, puis les fractions solubles et insolubles à ces températures sont séparées par centrifugation. Enfin, le surnageant soluble est ensuite précipité par un volume d'éthanol afin de récupérer la fraction spécifique. [38] met toutefois en évidence le fait que le volume d'éthanol utilisé influence la composition de la fraction récoltée. En effet, pour une température de solubilisation donnée, un surnageant obtenu après centrifugation donnera une gomme contenant une proportion croissante de galactose au fur et à

mesure que la quantité d'éthanol utilisée lors de la précipitation augmente. L'adjonction de grands volumes d'éthanol permet donc de précipiter une fraction plus soluble de la gomme (car plus riche en galactoses latéraux). La seconde, une technique par épuisement (soustractive), consiste à réextraire successivement le même échantillon dans des volumes d'eau de températures croissantes, pour générer les fractions suivantes, jusqu'à ce que plus aucune matière supplémentaire ne puisse être extraite [33]. Elle donne également des fractions de caractéristiques plus marquées que dans le premier cas de fractionnement, car la matière récupérée correspond à celle possédant les caractéristiques structurales la rendant soluble dans une gamme étroite de températures. En utilisant la première technique de fractionnement, une grande quantité de galactomannanes solubles à de plus basses températures vient enrichir la fraction concernée.

4.3. La relation structure-fonction

Le choix d'une température de travail lors de la clarification ou du fractionnement influera donc considérablement sur la structure chimique de la gomme obtenue. Une température de dissolution plus importante permettra de produire une gomme, clarifiée ou fractionnée, non seulement avec un rendement plus important, mais aussi avec une plus grande proportion de galactomannanes longs et plus pauvres en galactose. Ces fractions seront les plus efficaces pour promouvoir la gélification et les interactions synergétiques avec d'autres biopolymères [33]. Des compositions de gomme différentes, dues à des structures différentes, génèrent ainsi des propriétés physiques et fonctionnelles différentes en solution aqueuse [20, 28, 33, 52]. De nombreuses études permettent d'établir un lien entre la structure – principalement la longueur des chaînes et le rapport M/G – et les propriétés du galactomannane en solution.

En effet, la viscosité intrinsèque d'une solution est proportionnelle à sa masse moléculaire moyenne [53]. Ainsi, plus un galactomannane possède de chaînes longues, plus sa viscosité en solution est importante. Le comportement visqueux, bien que dépendant de la concentration, est également fortement influencé par le rapport M/G. Ainsi, des polysaccharides en possédant un faible présentent une viscosité peu importante [15, 54, 55]. L'étude de la viscoélasticité révèle aussi une influence de la structure du galactomannane sur les propriétés de la solution. Des chaînes plus longues et moins substituées généreront plus rapidement un comportement élastique [56, 57]. Enfin, des structures différentes de

galactomannanes se comportent différemment lors de la formation de gels par association à d'autres polysaccharides tels que les κ -carraghénanes [15, 58], l'agarose [15] et – le modèle le plus étudié – le xanthane. Il a ainsi été démontré que le degré d'interaction avec le xanthane est inversement proportionnel au DS_{Gal} [59, 60]. La tendance observée est la même lors de l'association aux κ -carraghénanes et à l'agarose. Ces comportements physiques résultent principalement des interactions intra-, inter- moléculaires, et inter-polyholosidiques, favorisés par les zones pauvres en galactose [61].

5. Conclusions

Le procédé industriel de fabrication et de purification de la gomme de caroube conditionne les caractéristiques de celle-ci et, par conséquent, ses potentialités d'applications. Dans ce procédé, la température de solubilisation des polysaccharides est le paramètre critique à contrôler.

Une température relativement basse sélectionne des galactomannanes de faibles masses molaires et de contenu en galactose important. Ces fibres ont un caractère hydrophile plus marqué. A contrario, une température de travail plus importante permet de solubiliser des galactomannanes plus longs et très pauvres en galactose, qui apporteront leurs contributions aux caractéristiques globales de la gomme obtenue. Cette gomme possédera une masse moléculaire moyenne plus importante et un degré de substitution en galactose plus faible. Ces deux types de gomme présenteront des propriétés physiques différentes en solutions aqueuses. Les premières possèdent des viscosités plus faibles mais immédiates (car solubles à faible température), tandis que les secondes présentent un comportement visqueux plus marqué mais nécessitent un chauffage préalable. Ces dernières sont également plus efficaces dans la formation de gels par association à d'autres polysaccharides, grâce aux possibilités d'interactions plus nombreuses qu'elles offrent de par leurs structures.

6. Références Bibliographiques

- [1] Biner B. *et al.*, 2007. Sugar profiles of the pods of cultivated and wild types of carob bean (*Ceratonia siliqua* L.) in Turkey. *Food Chem.*, **100**, 1453-1455.
- [2] Bouzouita N. *et al.*, 2007. The analysis of crude and purified locust bean gum: a comparison of samples from different carob tree populations in Tunisia. *Food Chem.*, **101**, 1508-1515.
- [3] Petit M. & Pinilla J., 1995. Production and purification of a sugar syrup from carob pods. *Lebensm. Wiss. u.-Technol.*, **28**, 145-152.
- [4] Dakia P. *et al.*, 2008. Composition and physicochemical properties of locust bean gum extracted from whole seeds by acid and water dehuling pre-treatment. *Food hydrocoll.*, **22**, 807-818.
- [5] Correia P. & Martins-Loucao M., 2005. The use of macronutrients and water in marginal Mediterranean areas: the case of carob tree. *Field Crops Res.*, **91**, 1-6.
- [6] Dakia P., 2003. *Extraction et caractérisation de la gomme de caroube (Ceratonia siliqua L.)*. Mémoire : Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux (Belgique).
- [7] Avalone R., Plessi M., Baraldi M., Monzani A., 1997. Determination of chemical composition of carob (*Ceratonia siliqua*) : protein, fat, carbohydrates, and tannins. *J. Food Compos. Anal.* **10**, 166-172.
- [8] Prajapati V. *et al.*, 2013. Locust bean gum : a versatile biopolymer. *Carbohydr. Polym.*, **94**, 814-821.
- [9] Dakia P., 2009. *Propriétés chimiques et rhéologiques des polysaccharides de l'endosperme des graines de caroubier (Ceratonia siliqua L.)*. Thèse de Doctorat : Faculté universitaire des Sciences agronomiques de Gembloux.
- [10] FAOSTAT, <http://faostat.fao.org/>, (13/03/2010).
- [11] Simon M., 2010. *Production enzymatique d'oligosaccharides à partir de gomme de caroube*. Mémoire : Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux (Belgique).
- [12] Yousif A. & Alghzawi H., 2000. Processing and characterization of carob powder. *Food Chemistry*, **69**, 283-287.
- [13] Dakia P., Wathelet B. & Paquot M., 2007. Isolation and chemical evaluation of carob (*Ceratonia siliqua* L.) seed germ. *Food Chem.*, **102**, 1368-1374.

- [14] Neukom, H., 1988. Carob bean gum : properties and applications. In Fito P. & Mulet A., Eds "*Proceeding of the II International Carob Symposium*". Valencia, Spain. 551-555.
- [15] Dea I. & Morrison A., 1975. Chemistry and interactions of seed galactomannans. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **31**, 241-312
- [16] Daas P., Schols H. & de Jongh H., 2000. On the galactosyl distribution of commercial galactomannans. *Carbohydr. Res.*, **329**, 609-619.
- [17] McCleary B. & Matheson N., 1974. A-D-galactosidase activity and galactomannan and galactosylsucrose oligosaccharide depletion in germinating legume seeds. *Phytochemistry*, **13**, 1747-1757.
- [18] McCleary B., 1980. Hydrolysis of galactomannans by α -D-galactosidase and β -D-mannanase. In "*mechanisms of saccharide polymerization and depolymerisation*". J. John. Marshall, Ed. Academic Press N.Y., pp. 285-300.
- [19] Moreira L. & Filho E., 2008. An overview of mannan structure and mannan degrading enzyme systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **79**, 165-178.
- [20] McCleary B., 1988. Guar and carob galactomannans. *Methods Enzymol.*, **160**, 523-527.
- [21] Sittikijyothin W., Torres D & Gonclaves M. P., 2005. Modelling the rheological behaviour of galactomannan aqueous solutions. *Carbohydr. Polym.*, **59**, 339-350.
- [22] Blakeney A., Harris P., Henry R. & Stone B. (1983). A simple and rapid preparation of alditol acetates for monosaccharide analysis. *Carbohydr. Res.*, **113**, 291-299.
- [23] Parvathy K., Susheelamma N., Tharanathan R. & Gaonkar A., 2005. A simple non-aqueous method for carboxymethylation of galactomannans. *Carbohydr. Polym.*, **62**, 137-141.
- [24] Bresolin T. *et al.*, 1997. Viscosimetric studies on xanthan and galactomannan systems. *Carbohydr. Polym.* **33**, 131-138.
- [25] Garti N. *et al.*, 1997. Fenugreek galactomannans as food emulsifiers. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, **30**, 303-311.
- [26] Baker C. & Whistler R., 1975. Distribution of D-galactosyl groups in guaran and locust-bean gum. *Carbohydr. Res.*, **45**, 237-243.
- [27] Painter T., Gonzalez J. & Hemmer P., 1979. The distribution of D-galactosyl groups in guaran and locust bean gum : new evidence from periodate oxidation. *Carbohydr. Res.*, **69**, 217-226.
- [28] Izydorczyk M. & Biliaderis C., 1996. Gradient ammonium sulphate fractionation of galactomannans. *Food hydrocoll.*, **10**, 295-300.

- [29] Grasdalen H. & Painter T., 1980. NMR studies of composition and sequence in legume-seed galactomannans. *Carbohydr. Res.*, **81**, 59-66.
- [30] Gidley M., McArthur A. & Underwood D., 1991. ¹³C NMR characterization of molecular structures in powders, hydrates and gels of galactomannans and glucomannans. *Food hydrocoll.*, **5**, 129-140.
- [31] McCleary B., 1991. Enzymic analysis of the fine-structure of galactomannan. *Methods Carbohydr. Chem.*, vol. X.
- [32] McCleary B., Clark A., Dea I. & Rees D., 1985. The fine structures of carob and guar galactomannans. *Carbohydr. Res.*, **139**, 237-260.
- [33] Pollard M. & Fischer P., 2006. Partial aqueous solubility of low galactose-content galactomannans – What is the quantitative basis? *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, **11**, 184-190.
- [34] McCleary B., Matheson N. & Small D., 1976. Galactomannans and galactoglucomannan in legume seed endosperms : structural requirements for β -mannanase hydrolysis. *Phytochemistry*, **15**, 1111-1117.
- [35] Cui S., 2001. *Polysaccharide gum from agricultural products: Processing, Structures and Fonctionality*. Lancaster: Technomic. ISBN 1-56676-934-5.
- [36] Azero E. G. & Andrade C. T., 2002. Testing procedure for galactomannan purification. *Polym. Test.*, **21**, 551-556.
- [37] Kawamura Y., 2008. *Carob bean gum (Chemical and Technical Assessment for the 69th JECFA)*, http://www.fao.org/fileadmin/templates/agis/pdf/jecfa/cta/69/Carob_bean_gum.pdf, (08/05/12).
- [38] Wielinga W., 1990. Production and application of seed gums. In Phillips, & Williams eds. *Gums and Stabilisers for the Food Industry 5*, 383-403. Oxford : IRL Press.
- [39] Hefti M., 1953. Process for the extraction of mucilages from seeds. UK Patent application GB 19530014813 19530527. 1953-05-27.
- [40] Ind Agricolas Levantinas, 1954. Improvements relating to the treatment of carob beans. UK Patent application GB 19540017447 19540614. 1954-06-14.
- [41] Brummer Y., Cui W. & Wang Q., 2003. Extraction, purification and physiochemical characterization of fenugreek gum. *Food Hydrocoll.*, **17**, 229-236.
- [42] Lopez da Silva J. & Gonçalves M., 1990. Studies on a purification method for locust bean gum by precipitation with isopropanol. *Food Hydrocoll.*, **4**, 277-287.
- [43] Alves M., Yu Antonov A., Luciano L. & Gonçalves M., 1999. Solution properties of the galactomannans extracted from the seeds of *Caesalpinia*

pulcherrima and *Cassia Javanica* : Comparaison with locust bean gum. *Int. J. Biol. Macromol.*, **267**, 181-185.

[44] Andrade C., Azero E., Luciano L. & Gonçalves M., 1999. Solutions properties of the galactomannans extracted from the seeds of *Caesalpinia pulcherrima* and *Cassia javanica*: comparaison with locust bean gum. *Int. J. Biol. Macromol.*, **26**, 181-185.

[45] Rafique C. & Smith F., 1950. The constitution of guar gum. *J. Am. Chem. Soc.*, **72**, 4634-4637.

[46] Andrews P., Hough L. & Jones J., 1952. Mannose-containing Polysaccharides. I. The galactomannans of Lucerne and Clover Seeds. *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 4029-4032.

[47] Kapoor V., 1972. A galactomannan from the seeds of *delonix regia*. *Phytochemistry*, **11**, 1129-1132.

[48] Pollard M. *et al.*, 2006. "Why are locust bean galactomannans partially soluble?" *Proceedings of the 4th International Symposium on Food Rheology and Structure*, Zurich, Switzerland, February 19-23, 373 - 376.

[49] Pollard M. *et al.*, 2007. Investigation of equilibrium solubility of a carob galactomannan. *Food Hydrocoll.*, **21**, 683-692.

[50] Kök M., Hill S. & Mitchell J., 1999. Viscosity of galactomannans during high temperature processing: influence of degradation and solubilisation. *Food Hydrocoll.*, **13**, 535-542.

[51] Richardson P. *et al.*, 1999. Galactomannan gelation : a thermal and rheological investigation analyzed using the cascade model. *Macromolecule*, **32**, 1519-1527.

[52] Gaisford S., Harding S., Mitchell J. & Bradley T., 1986. A comparison between the hot and cold water soluble fractions of two locust bean gum samples. *Carbohydr. Polym.*, **6**, 423-442.

[53] Richardson P., Willmer J. & Foster T., 1998. Dilute properties of guar and locust bean gum in sucrose solutions. *Foods hydrocoll.*, **12**, 339-348.

[54] Doublier J. & Launay B., 1981. Rheology of galactomannan solutions : a comparative study of guar gum and locust bean gum. *J. Texture Stud.*, **12**, 151-172.

[55] Rizzo V., *et al.*, 2004. Rheological properties and sugar composition of locust bean gum from different carob varieties (*Ceratonia siliqua* L.). *J. Agric. Food Chem.*, **52** (26), 7925-7930.

[56] Fernandes P., 1994. Determination of the physical functionality of galactomannans in kappa-carrageenan/galactomannan mixed systems by periodate oxidation. *Food Chem.*, **49**, 367-371.

- [57] Lazaridou A., Biliaderis C. & Izydorczyk M., 2000. Structural characteristics and rheological properties of locust bean galactomannans : a comparaison of samples from different carob tree populations. *J. Sci. Food Agric.*, **81**, 68-75.
- [58] Rochas C., Taravel F. & Turquois T., 1990. N.m.r. studies of synergistic kappa carrageenan-carob galactomannan gels. *Int. J. Biol. Macromol.*, **12**, 353-358.
- [59] McCleary B., Amado R., Waibel R. & Neukom H., 1981. Effect of galactose content on the solution and interaction properties of guar and carob galactomannans. *Carbohydr. Res.*, **92**, 269-285.
- [60] Dea I. *et al.*, 1977. Association of like and unlike polysaccharides: mechanism and specificity in galactomannans, interacting bacterial polysaccharides, and related systems. *Carbohydr. Res.*, **57**, 249-272.
- [61] Dea I., Clarck A. & McCleary B., 1986. Effect of the molecular fine structure of galactomannans on their interaction properties – the role of unsubstituted sides. *Food Hydrocoll.*, **1**, 129-140.

3

La relation structure chimique-propriétés physiques des galactomannanes extraits de la caroube

Gillet, S., Blecker, C., Paquot, M., & Richel, A. (2014). La relation structure chimique-propriétés physiques des galactomannanes extraits de la caroube. *Comptes Rendus Chimie*, 17(4).

Note introductive

Le chapitre précédent a permis de mettre en évidence l'impact du procédé d'extraction et de purification sur les propriétés de la gomme. Le paramètre déterminant, identifié à ce niveau, était la solubilité des galactomannanes. Celle-ci est impactée par la température de travail et va conditionner les propriétés de la gomme.

Cette analyse reste cependant incomplète. La solubilisation lors du procédé de purification va effectivement influencer les propriétés de la gomme, mais indirectement. En réalité, tant la solubilité que les propriétés sont liées à la structure fine des galactomannanes. La relation structure chimique – propriétés physiques des galactomannanes fera donc l'objet de ce chapitre.

Les galactomannanes sont constitués d'une chaîne principale de mannosyls sur laquelle se situent un certain nombre de substituants galactosyls. Trois principaux éléments de caractérisation structurale des galactomannanes (au sens large) sont décrits dans la littérature : le degré de substitution en galactose, la longueur des chaînes et la distribution des unités galactosyls. Ces caractéristiques sont mises en relation avec des propriétés physiques telles que la solubilité, la rhéologie, et la formations de gels isolés ou combinés avec d'autres saccharides.

Cette synthèse permet ainsi de rassembler et de structurer l'ensemble des connaissances sur le sujet et permettra ainsi d'analyser et d'interpréter les résultats présentés à la seconde section en regard des connaissances scientifiques en la matière. En outre, les aspects théoriques indispensables aux techniques de caractérisation structurales ou physico-chimiques et utilisées dans le cadre de ce travail y sont également présentés.

D'autre part, cette synthèse a également permis de mettre en avant certaines zones d'ombres sur le sujet. Ainsi, il apparaît que généralement, seuls les degrés de substitutions en galactose et les longueurs de chaînes sont les paramètres déterminés et mis en relation avec certaines propriétés dans la plupart des études traitant des galactomannanes (la distribution des galactosyls est pourtant très importante). Souvent, aucun paramètre n'est même déterminé et les auteurs d'études interprètent les propriétés observées sur base d'une structure communément admise pour les galactomannanes.

De cette synthèse découle la stratégie mise en œuvre dans la section expérimentale et qui vise à mettre en relation la structure chimique fine (distribution des galactosyls incluse) réellement déterminée avec un ensemble de propriétés.

1.	Abstract	53
2.	Introduction	53
3.	La caroube : origine, situation et description.....	55
4.	Extraction et purification de la gomme de caroube.....	56
5.	Les galactomannanes de caroube, leurs structures fines et leurs conformations en solutions aqueuses	57
5.1.	La composition en galactosyls latéraux.....	57
5.2.	La structure fine de la gomme	58
5.3.	La masse moléculaire des galactomannanes.....	61
5.4.	La conformation des galactomannanes en milieu aqueux	63
6.	Les propriétés des galactomannanes en solutions aqueuses	65
6.1.	Solubilité et influence de la température sur les caractéristiques de la gomme de caroube	65
6.1.1.	La solubilisation des galactomannanes	65
6.1.2.	L'impact de la température sur la solubilisation.....	67
6.1.3.	Le fractionnement de la gomme de caroube.....	70
6.2.	Les propriétés visqueuses, viscoélastiques et l'autoassociation des galactomannanes de caroube	72
6.2.1.	La viscosité intrinsèque.....	72
6.2.2.	La viscosité dynamique.....	75
6.2.3.	Les propriétés viscoélastiques.....	77
6.2.4.	La formation d'hydrogels.....	78
6.3.	Formation de gels par association à d'autres polyholosides.....	79
7.	Conclusions	83
8.	Bibliographie	86

1. Abstract

Carob galactomannan fine chemical structure is closely related to the physical behavior developed in aqueous solution. Three elements of structural characterization are mainly described in the literature: the degree of galactose substitution, chain length, and galactose units distribution. This review article will attempt to highlight the impact of different structural features on physical properties such as solubility, viscosity, formation of hydrogels or gels in combination with other saccharides. The impact of industrial purification process on the structure and physical properties is also developed.

2. Introduction

La gomme de caroube, connue dès l’Egypte ancienne, est un composé dont l’utilisation industrielle remonte au début du 20^{ème} siècle. Dans les années 1940, lorsque les restrictions liées à la guerre rendaient difficile son approvisionnement, il fut nécessaire de lui trouver un substituant, ce qui a conduit à l’émergence de la gomme de guar [1]. La gomme de caroube a retrouvé par la suite ses lettres de noblesse et est, à l’heure actuelle et grâce à sa capacité d’autoassociation, un additif alimentaire (E410) utilisé industriellement pour ses propriétés texturantes (épaississantes et viscosifiantes) et stabilisantes [2]. Elle entre notamment dans la composition des crèmes glacées, des soupes, des friandises, des aliments pour bébés, des produits laitiers, des boissons alcoolisées et non-alcoolisées, des aliments pour bétail, etc. [3-12]. La gomme de caroube possède également la propriété de former des gels par association à d’autres polysaccharides (carraghénanes, xanthane, agarose, etc.), à des concentrations bien inférieures à une utilisation de ces polysaccharides seuls. Il est, dès lors, économiquement intéressant d’y avoir recours comme agent co-gélifiant pour des applications telles que les crèmes lactières, les crèmes fouettées, les crèmes glacées sans lait, le surimi, les boulettes de viande allégées, les analogues de mozzarella, etc. [13-16]. Dans les produits de boulangerie, l’adjonction de gomme de caroube prévient ou retarde la rétrogradation des amidons et des amidons modifiés et influe sur la viscosité de ces derniers [17]. La gomme de caroube est également utilisée en tant qu’additif pour des applications non-alimentaires dans l’industrie papetière, cosmétique, textile et pharmaceutique [4 ; 18-21], où ses propriétés d’agent de libération contrôlée de médicament sont prises

[22] ainsi que sa capacité de co-gélification, utilisée en encapsulation de principes actifs [23].

La gomme est fabriquée à partir de l'endosperme des graines du caroubier (*Ceratonia siliqua* L.). Cet endosperme est composé de polysaccharides de réserve (hémicelluloses) appelés galactomannanes. Ils sont constitués d'une chaîne principale de mannose sur laquelle sont greffés des substituants latéraux : les résidus galactosyles (figure 1). Les galactomannanes, une fois extraits et purifiés, conféreront à une solution aqueuse de gomme de caroube les propriétés texturantes tant recherchées par l'industrie. Les propriétés physiques de la gomme en solution sont intimement liées à sa structure moléculaire fine, qui est elle-même dépendante du procédé de fabrication et de purification de la gomme de caroube.

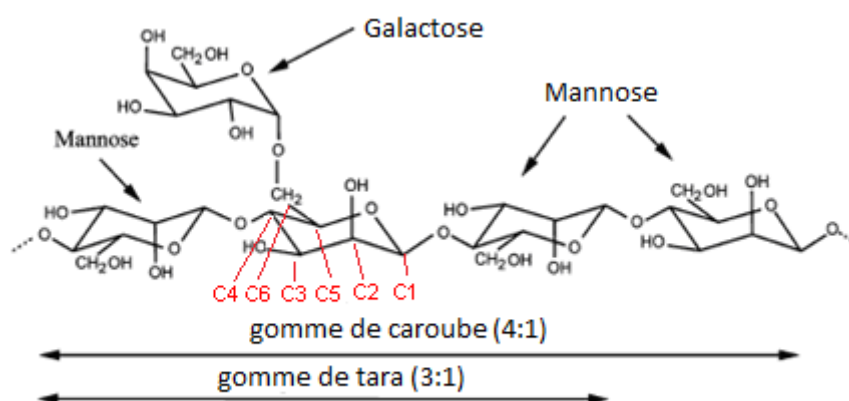


Figure 1. Structure des galactomannanes de la gomme de caroube et de la gomme tara.
Adapté d'après [76]. *Figure 1: Structure of locust bean and tara galactomannans. According to [76].*

Il existe donc, dans la littérature scientifique, plusieurs théories visant à mettre en relation la structure chimique et le comportement en solutions aqueuses, et vice versa [7-9 ; 24-37]. Malheureusement, bien souvent, les seuls paramètres pris en compte dans ces modèles sont la masse moléculaire et le degré de substitution en galactose. Pourtant, le motif de distribution des résidus galactosyles latéraux semble impacter profondément les caractéristiques physiques d'une solution de galactomannanes.

Le présent article a donc pour objectif de réintégrer ce paramètre à la discussion, tout en dressant un état des lieux, le plus complet possible, des relations structures-fonctions des galactomannanes de caroube.

3. La caroube : origine, situation et description.

Le caroubier ou *Ceratonia siliqua* L., de la famille des *Caesalpiniaceae*, est un arbuste dioïque à feuilles persistantes et de croissance lente [4 ; 19]. C'est une essence thermophile cultivée en climat méditerranéen, mais originaire des pays arabes [38]. Elle est souvent utilisée pour lutter contre la déforestation et l'érosion des sols [39]. Le *Ceratonia siliqua* atteint une taille de 15 à 17 mètres et a une durée de vie de 200 – 500 ans. Ses fleurs, petites et rouges, donneront après fécondation naissance aux fruits appelés gousses. La gousse du caroubier, nommée caroube, est composée de pulpe et de graines. La composition de la pulpe de caroube dépend de la variété, du climat et des techniques de cultures. Toutefois, on peut avancer que la pulpe de caroube représente 90% de la masse du fruit. Elle est riche en tanins et en sucres, dont le saccharose représente 65 à 75% des sucres totaux [38]. Les graines constituent environ 10% de la masse de la gousse et sont exploitées dans l'industrie agroalimentaire pour leurs propriétés texturantes [19 ; 38]. Elles sont composées de 3 parties : la coque (téguments), l'endosperme et la radicule.

L'endosperme se trouve sous les téguments. Il représente 40 à 50 % de la masse de la graine et constitue la matière de base utilisée dans la fabrication de la « gomme de caroube » [40]. L'endosperme renferme les polysaccharides de réserve appelés « galactomannanes ». Au centre de l'endosperme se trouve la radicule (ou embryon), représentant entre 15 et 30 % de la masse sèche de la graine [40]. Celle-ci possède une valeur énergétique élevée due à son taux important de protéines principalement solubles dans l'eau et de lipides majoritairement insaturés. Elle est employée pour la nutrition du bétail et comme aliment diététique [18]. La radicule contient également un certain nombre d'enzymes : des endo-1,4- β -mannanases, des α -galactosidases et des β -mannosidases, susceptibles d'hydrolyser les galactomannanes lors, par exemple, d'un processus de germination [41].

4. Extraction et purification de la gomme de caroube

L'endosperme de la graine de caroube peut être extrait et broyé pour donner naissance à une poudre appelée « gomme de caroube ». Le procédé d'extraction utilisé doit veiller à ne pas dégrader les galactomannanes afin que leurs propriétés technofonctionnelles demeurent intactes, tout en garantissant une certaine pureté à la gomme obtenue. Les enzymes résiduelles doivent également être dénaturées afin de ne pas hydrolyser les galactomannanes lors de la mise en solution aqueuse de la gomme. La première étape du procédé général de fabrication de la gomme de caroube consiste à extraire mécaniquement les graines des cosses [42]. La seconde étape, nommée « décutilation » a pour but d'éliminer les téguments. Quatre procédés principaux existent : le traitement chimique à l'acide [5 ; 42 ; 43] ; le procédé thermique par rôtissage [5 ; 43 ; 44] ; le procédé mécanique utilisant des broyeurs à marteaux et des décortiqueuses [42] ; le traitement par trempage et congélation [45]. L'étape suivante consistera en l'élimination du germe. Celui-ci sera donc écrasé par broyage mécanique et enlevé principalement par tamisage. Il ne reste alors plus que les endospermes qui seront broyés en fines particules pour obtenir la gomme de caroube [46].

Des traitements de purification ont ensuite lieu dans le but d'éliminer les odeurs, les impuretés et les enzymes endogènes [9]. La clarification, le processus le plus répandu, consiste en une solubilisation de la gomme dans de l'eau [5], de la soude ou de l'acide acétique [1] suivie d'une étape de filtration [5] ou de centrifugation [1] pour éliminer les insolubles. Les galactomannanes seront ensuite précipités à l'aide de solvants tels que l'éthanol [47], l'isopropanol [48-50] ou le méthanol [51]. La précipitation des galactomannanes peut également être obtenue par la formation de complexes cuivriques [47 ; 52] ou de baryum [53]. La précipitation dans du tampon borate est également citée dans la littérature scientifique [9 ; 54]. L'état de purification a une grande influence sur la composition et les propriétés de la gomme de caroube. Lors de la clarification, la température de dissolution influence considérablement la composition de la gomme obtenue et les propriétés physicochimiques qui en découlent. Ainsi, une gomme de caroube purifiée à froid présente des propriétés significativement différentes de celle extraite à chaud [55]. La température n'est pas le seul facteur impactant sur les propriétés de la farine de caroube clarifiée. La proportion de solvant utilisé lors de la précipitation joue également un rôle important.

5. Les galactomannanes de caroube, leurs structures fines et leurs conformations en solutions aqueuses

Les galactomannanes sont constitués d'une chaîne principale de résidus D-mannopyranoses liés en β -(1 \rightarrow 4) sur laquelle se greffent des résidus D-galactopyranoses uniques grâce à une liaison de type α -(1 \rightarrow 6) (figure 1) [56 ; 34]. Cette structure est basée principalement sur les résultats d'analyses de méthylation et des expériences d'hydrolyse partielle. Ainsi, la méthylation et l'hydrolyse subséquente génèrent des solutions mixtes de 2,3,4,6-tetra-O-methyl-D-galactose, de 2,3,6-tri-O-methyl-D-mannose, et de 2,3-di-O-methyl-D-mannose, tandis que des hydrolyses partielles produisent des disaccharides de 6-O- α -D-galactopyranosyl-D-mannose et de 4-O- β -D-mannopyranosyl-D-mannose [1]. Cette structure de base est communément admise pour tous les galactomannanes. Trois éléments vont cependant permettre d'établir leurs structures fines et ainsi de distinguer les différents types de galactomannanes : le rapport mannose/galactose, la distribution des résidus galactose le long de la chaîne de mannose et la longueur des chaînes.

5.1. La composition en galactosyls latéraux

Le rapport mannose/galactose (M/G) est généralement déterminé par la méthode de Blakeney [57]. Il peut, en fait, varier de 10 à 1 en fonction de l'espèce végétale [58]. Les galactomannanes constituant une gomme de caroube brute possèdent, en moyenne, un M/G de 4. Ce rapport est toutefois à nuancer car il peut varier selon les conditions de culture (conditions climatiques, composition du sol, variété et âge de l'arbre, etc.) et le procédé de fabrication de la gomme [19 ; 59]. La gomme de guar et la gomme tara – deux autres gommes commercialement importantes – possèdent un rapport moyen de 2 et 3 respectivement [60]. On utilise également dans la littérature le degré de substitution en galactose (DS_{Gal}) à la place du rapport M/G. Il correspond à la masse de galactose divisée par la masse de mannose [$DS_{Gal} = G/M = 1/(\text{rapport M/G})$].

5.2. La structure fine de la gomme

L'intérêt commercial porté aux galactomannanes a débouché sur l'étude de la distribution des résidus D-galactopyranoses sur la chaîne principale de résidus D-mannopyranoses. Malgré l'utilisation relativement ancienne de ces gommages, l'élucidation de la structure fine des galactomannanes n'a débuté que bien plus tard (années 1960-1970), avec l'apparition et la généralisation de certaines techniques de mesure. Les premières études réalisées ont mis en œuvre des α -D-galactosidases [61 ; 62] et des β -D-mannanases [61]. Ces enzymes testées sur des galactomannanes, de même rapport M/G mais d'origines botaniques différentes, ont généré des cinétiques d'hydrolyse et des produits de dégradation très différents. Il apparaît ainsi que l'arrangement des substituants galactosyl sur la chaîne de mannose est très différent d'un galactomannane à l'autre et est vraisemblablement lié à l'espèce végétale d'origine [33 ; 55]. La distribution des groupes D-galactosyl le long de la chaîne principale de mannose serait donc la conséquence de mécanismes de synthèse *in vivo*, qui impliquent probablement des transférases D-mannosyl et D-galactosyl fonctionnant de concert et variant significativement d'une espèce à l'autre selon les différences structurales autour des sites actifs des enzymes [63]. Sur base de ces observations, différents types de répartition ont été proposés : la disposition régulière, la disposition aléatoire et la disposition en blocs uniformes (figure 2). Des intermédiaires entre ces trois structures « types » peuvent également exister dans la nature [1].

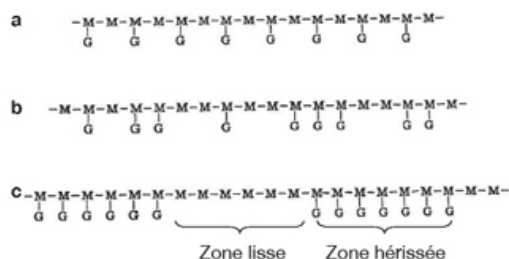


Figure 2. Distribution des résidus galactoses sur la chaîne de mannoses : (a) répartition régulière, (b) répartition aléatoire, (c) répartition en blocs uniformes. Adapté d'après [1].

Figure 2: Galactose distribution along the main chain of mannose : (a) regular arrangement, (b) random distribution, (c) distribution in uniform blocks. According to [1].

L'élucidation spécifique de la structure de la gomme de caroube a été proposée pour la première fois en 1975 en utilisant une technique de dégradation alcaline (figure 3) [64]. Cette étude a pu démontrer que la gomme de caroube ne contient pas de chaînes latérales disposées de manière régulière. Ses résidus latéraux sont situés sur des blocs de résidus mannose, chaque bloc substitué étant composé de 25 résidus mannose. En considérant que la masse moléculaire de la gomme de caroube est d'environ 210 000 Daltons et que les blocs substitués sont séparés par des séquences d'unités de mannose non-substituées de longueurs égales, on peut estimer le nombre d'unités mannose de chaque bloc non-substitué à 85. La même méthode appliquée à la gomme de guar démontre, par contre, une structure primaire régulière [64].

La structure proposée pour la gomme de caroube a ensuite varié et été affinée avec l'évolution des techniques d'analyse. Plusieurs études complémentaires ont ainsi apporté certaines précisions quant à la structure chimique des galactomannanes issus de la gomme de caroube. La méthode d'oxydation au périodate a d'abord mis en évidence que la gomme de caroube était constituée de longs blocs de résidus mannose non-substitués, de longs blocs dans lesquels chaque second résidu mannose est substitué par un galactose, et de blocs plus courts dans lesquels il y a une haute densité en substituants galactose [65].

Par la suite, le recours à la résonance magnétique nucléaire du ^{13}C [66-68] a pu informer sur la proportion entre les disaccharides de mannose di- mono- et non-substitués en galactose et sur la proportion de triplets de mannoses tri- di- et mono substitués en galactose. Il est ainsi possible d'estimer la répartition des galactoses sur la chaîne de mannose. Ces études accréditent la thèse d'une répartition des galactoses sous forme de blocs, du moins pour une certaine fraction de la gomme de caroube. Cette théorie semble confirmée par des études de résonance magnétique nucléaire en phase solide sur un gel de gomme de caroube. Le mannose y apparaît sous deux populations dynamiques différentes, traduisant des différences de mobilité au sein de la structure. La population la moins mobile pourrait correspondre aux blocs non-substitués du galactomannane impliqués et bloqués dans des interactions intra et inter-moléculaires [69]. Plus récemment, des travaux de résonance magnétique nucléaire à deux dimensions prétendent que les substituants galactosyls sont eux-mêmes substitués par – au minimum – deux galactopyranoses liés en α (1-4) [70]. Ce modèle, en rupture avec la structure de base communément admise, n'est toutefois pas confirmé par les études de méthylation et d'hydrolyses partielles.

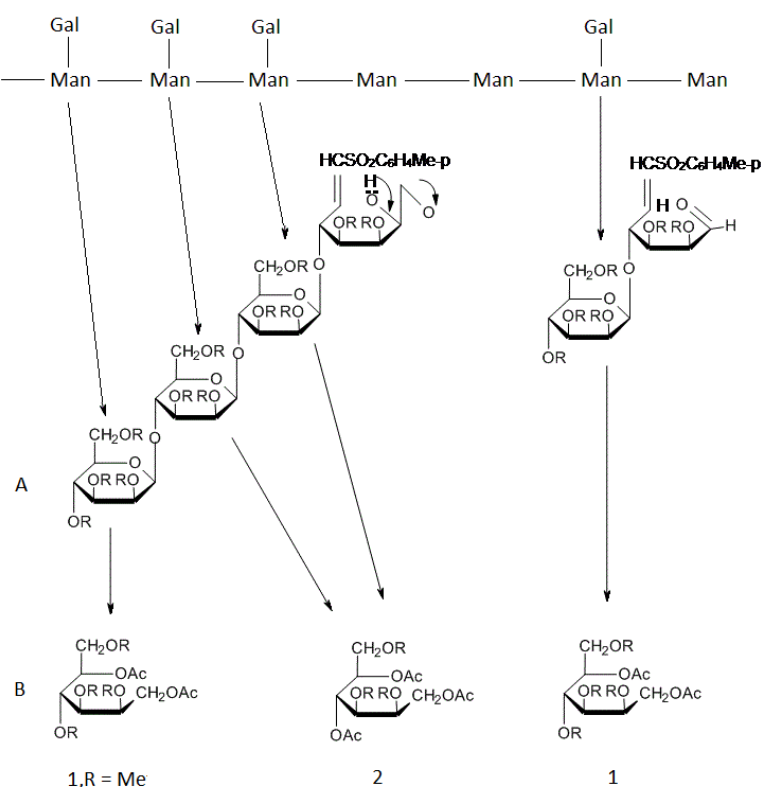


Figure 3. Dégradation alcaline par : (A) β -élimination et méthylation, suivie par (B) hydrolyse acide, réduction et acétylation [64]. Avec l'autorisation d'Elsevier. *Figure 3: Alkaline degradation by: (A) β -elimination and methylation followed by (B) acid hydrolysis, reduction and acetylation [64]. With permission of Elsevier.*

Le dernier type d'études réalisées met en œuvre une hydrolyse enzymatique suivie d'une simulation par ordinateur [58 ; 71 ; 72]. Cette approche implique la caractérisation et la quantification des oligosaccharides produits par hydrolyse de galactomannanes par des β -mannanases hautement purifiées ainsi que la connaissance complète de la cinétique d'action de celles-ci. A partir de là, un modèle décrivant les besoins en sites de liaison des enzymes étudiées a été établi. En confrontant ce modèle aux oligosaccharides obtenus lors de l'hydrolyse, il est possible de déduire la structure originelle du polysaccharide étudié. Les résultats apportent des précisions supplémentaires à ceux obtenus jusque-là. La distribution des résidus galactose y est irrégulière, avec une haute proportion de doublets

substitués, une proportion plus faible de triplets substitués, et l'absence de blocs de substitution. La probabilité de séquences dans lesquelles des résidus de mannoses sont substitués alternativement est faible. La distribution probabiliste des tailles de blocs des résidus mannoses non-substitués indique qu'il y a une plus grande proportion de blocs de taille intermédiaire que celle que l'on retrouverait dans des galactomannanes avec une distribution aléatoire des substituants. Il ne convient dès lors plus de parler de blocs entièrement substitués.

La structure fine des galactomannanes de caroube est donc constituée de zones « lisses », faiblement substituées et de zones « hérissées » beaucoup plus denses en galactoses latéraux, sans pour autant qu'ils soient systématiquement adjacents. Ces dernières années, aucune nouvelle étude sur la détermination structurale de la gomme de caroube n'a été publiée. La structure en zones « lisses » et zones « hérissées » est celle qui est donc communément admise (bien que difficile à démontrer avec certitude) et qui sert de base de discussion à la plupart des auteurs lors d'études de caractérisation des propriétés fonctionnelles de la gomme de caroube.

5.3. La masse moléculaire des galactomannanes

La masse moléculaire est également un élément important à prendre en compte dans la caractérisation de la structure moléculaire d'un polysaccharide. Il est en effet susceptible de modifier les propriétés physiques du polymère en solution. Les galactomannanes, comme tous les polysaccharides naturels et polymères de synthèse, ont tendance à être polydispersés, et par conséquent, sont décrits par une masse moléculaire moyenne [30]. La valeur de la masse moléculaire moyenne est fortement dépendante des conditions de préparation des solutions de galactomannanes ainsi que de la technique de mesure utilisée. La température de solubilisation est le facteur clé qui va le plus influencer les valeurs des masses moléculaires. Plus elle est importante et plus les valeurs de masses moléculaires mesurées et les rendements de solubilisation seront également importants (figure 7). La durée de dissolution d'un échantillon est aussi un élément important. Au-delà de 2 heures de temps, elle n'aura toutefois pas d'influence sur la masse moléculaire mesurée [32]. La taille de la mouture de la poudre de caroube ne semble pas influencer la masse moléculaire des galactomannanes [32].

Deux types de techniques de mesures de masses moléculaires sont principalement utilisées :

- (A) Les méthodes chimiques permettent d'estimer la masse moléculaire moyenne en nombre \overline{M}_n . Cette grandeur ne dépend que du nombre de molécules de polymère, indépendamment de leur forme et leur masse.
$$\overline{M}_n = \frac{\sum_i N_i \cdot M_i}{\sum_i N_i}$$

Avec: N_i , le nombre de polymères de masse moléculaire M_i . Les méthodes basées sur la réduction des groupements terminaux de chaque chaîne [73] nécessitent des polysaccharides hautement purifiés, tandis que celles utilisant l'oxydation au périodate sont souvent exposées à une hyper-oxydation. Elles sont donc souvent imprécises [1]. Les M_n de la gomme de caroube brute se situent aux alentours de 300 000 Daltons [1 ; 74]. Ce sont les valeurs les plus généralement reprises dans la littérature. Des valeurs similaires sont obtenues lors de mesures réalisées par ultracentrifugation analytique [34].

- (B) Des résultats différents sont observés lors du recours aux méthodes basées sur la transmission d'une onde lumineuse. Ces-dernières déterminent la masse moléculaire moyenne en masse M_w .
$$\overline{M}_w = \frac{\sum_i N_i \cdot M_i^2}{\sum_i N_i \cdot M_i} = \frac{\sum_i w_i \cdot M_i}{\sum_i w_i}$$

Cette grandeur ne dépend pas que du nombre de molécules, mais aussi de la masse des molécules de polymère. Avec: w_i , la masse totale de toutes les molécules de masse moléculaire M_i . Certains auteurs estiment ainsi, par chromatographie d'exclusion stérique, à environ 1000 000 Daltons le M_w de la gomme de caroube dans de l'eau [32]. Les valeurs obtenues dans de telles conditions sont souvent artificiellement élevées par l'agrégation (association) intermoléculaire.

Les phénomènes d'agrégation ont été mis en évidence, même à des très faibles concentrations ($C = 0,1 \%$), dans certains solvants d'analyse, tels que l'eau. Une même gomme de caroube mesurée, par chromatographie d'exclusion stérique, dans de l'eau et du tampon phosphate donnera ainsi des valeurs de M_w forts différentes, respectivement de 820 000 Daltons et 370 000 Daltons [35]. La valeur obtenue de la masse moléculaire est donc fortement affectée par la conformation de la molécule en solution aqueuse et la concentration, responsables des propriétés d'auto-interaction. Ce phénomène est particulièrement marqué pour les polymères possédant de nombreuses séquences non-substituées [75].

5.4. La conformation des galactomannanes en milieu aqueux.

La conformation la plus probable des galactomannanes en solution aqueuse semble être en ruban (« ribbon-like ») [56]. Dans cette structure en 3 dimensions, le C₆ du résidu mannosyl est localisé à l'extérieur de la chaîne principale (figure 4 et 5). La liberté de rotation au niveau des liens glycosidiques est très réduite et, par conséquent, les chaînes latérales de D-galactosyl de mannoses adjacents ou séparés par un nombre pair d'unités, vont se situer sur des côtés opposés de la chaîne principale. Ceux qui sont séparés par un nombre impair d'unités mannose resteraient du même côté de la chaîne principale [56]. Dans d'autres travaux, la conformation des galactomannanes en solution aqueuse est moins ordonnée et de type pelote (« Random Coil ») (figure 5) [25 ; 76]. Enfin, d'après une autre étude, les galactomannanes peuvent tantôt adopter une conformation plus ordonnée en ruban, tantôt adopter une conformation en pelote aléatoire (figure 5) [77]. La conformation plus ordonnée serait privilégiée lors de la formation de gels, tandis que la pelote est favorisée en solutions aqueuses. La structure de la pelote est, en outre, susceptible de varier selon le mode de distribution des D-galactosyl latéraux. Ainsi, une étude de prédiction informatique informe que plus le nombre zones lisses est important, plus la pelote sera étendue en solution aqueuse [78]. Ces résultats sont assez contradictoires avec d'autres modèles existants, où l'existence de zones lisses est présentée comme favorisant les interactions intra-chaînes qui réduisent le volume hydrodynamique (figure 6) [48 ; 79].

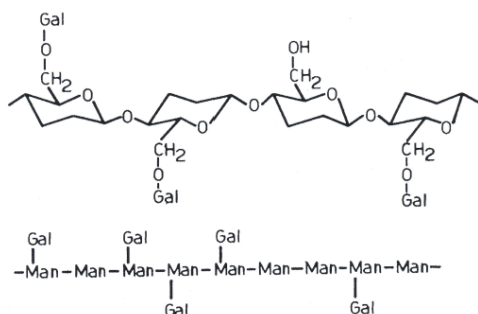


Figure 4. Conformation possible des galactomannanes en solution aqueuse et arrangement des chaînes latérales de galactosyles [56]. Avec l'autorisation d'Elsevier. *Figure 4: Probable conformation of galactomannans in aqueous solution and arrangement of galactosyl side chains [56]. With permission of Elsevier.*

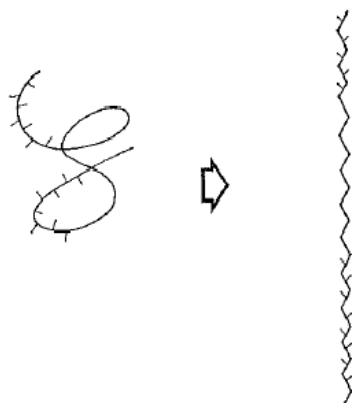


Figure 5. Les deux conformations des galactomannanes – en hérissé, les zones substituées – à gauche, la pelote aléatoire ; à droite, la forme en ruban [77]. Avec l'autorisation d'Elsevier.
Figure 5: The two conformations of galactomannans - the substituted areas are bristling – on the left, random coil, on the right, ribbon-like [77]. With the permission of Elsevier.

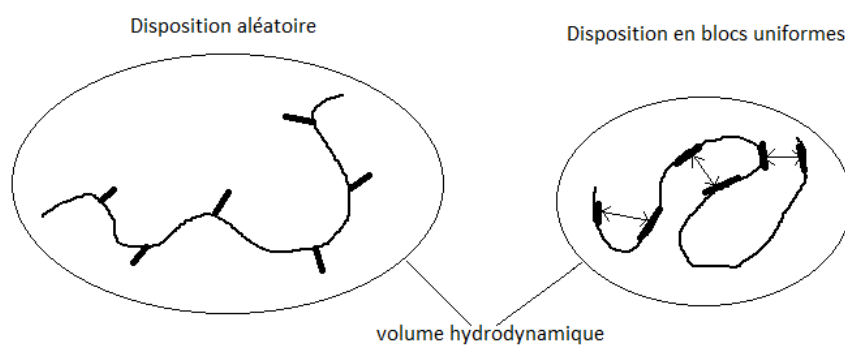


Figure 6. Intervention des zones « lisses » dans les interactions intramoléculaires. Adapté d'après [48]. *Figure 6: Intervention of "smooth" areas in the intramolecular interactions. According to [48].*

6. Les propriétés des galactomannanes en solutions aqueuses

Les propriétés physiques des galactomannanes de caroube en solutions aqueuses qui sont développées dans ce chapitre sont celles qu'il est possible de mettre en relation avec la structure. Il s'agit de la solubilité, de la viscosité et viscoélasticité, de la formation d'hydrogels et de gels associés à d'autres polyholosides. L'impact de la gomme de caroube dans des formulations plus complexes (de type alimentaire) n'apporte pas d'éléments nouveaux de réflexion à la question de la relation structure-fonction. Il ne sera donc pas abordé dans ce travail.

6.1. Solubilité et influence de la température sur les caractéristiques de la gomme de caroube

6.1.1. La solubilisation des galactomannanes

L'étude de la solubilité des polysaccharides en milieu aqueux est très importante car elle est intimement liée aux autres propriétés que ces polymères développent en solution. D'un point de vue pratique, la solubilité en solution aqueuse des galactomannanes de caroube s'exprime par le biais d'un pourcentage mesurant la proportion du produit restant en solution suite à une centrifugation. Cette solubilité dépend des dissolutions préalables, de l'équilibre entre les interactions molécules-molécules et molécules-solvant, de la nature physico-chimique des molécules ainsi que de l'état physique de la matière. La solubilité dans l'eau de la gomme de caroube est relativement faible. Plusieurs techniques ont donc été avancées pour augmenter cette solubilité. La carboxylation, la formation d'éther, l'hydroxyalkylation, l'estérification et la formation de dérivés phosphates en font partie [37]. Certains auteurs se sont intéressés à l'étude de la solubilité de la gomme de caroube.

Des analyses de diffraction aux rayons X aux grands angles ont ainsi montré que la poudre de caroube brute ou clarifiée avait, classiquement, un profil amorphe [67]. Par opposition, d'autres galactomannanes commerciaux, tels que le fenugrec, présentent un profil cristallin. En réalité, plus le DS_{Gal} augmente, plus la tendance à

la cristallinité augmente. Dans le cas de la gomme de caroube, la solubilité n'est donc pas liée à une quelconque fusion de zones cristallines. La dissolution correspond principalement à une extraction polymère-solvant [31]. Il s'agit d'un partitionnement thermodynamique des chaînes de polymères entre la phase solide amorphe du polymère, gonflée par le solvant, et la phase de solvant pure environnante. Ce partitionnement dépend de la concentration et de la température de la solution mais également des caractéristiques structurales des polymères. Le degré de substitution en galactose (DS_{Gal}) et la masse moléculaire (M_w) sont les seules caractéristiques structurales dont l'influence sur le comportement de solubilité des galactomannanes a été régulièrement étudiée. Contrairement à la distribution des substituants galactosyls, ces deux paramètres présentent l'avantage de pouvoir être déterminés assez facilement.

Sans une proportion de groupements latéraux ($DS_{Gal} = 0$), un polysaccharide isolé est instable en solution et va cristalliser ou précipiter [32]. Les galactomannanes avec un DS_{Gal} généralement au dessus de 0,4 tels que la gomme de guar (0,5) ou de fenugrec (0,9) sont considérés comme solubles dans des solutions aqueuses diluées ou semi diluées et thermodynamiquement stables. Ils présentent une structure aléatoirement enroulée dans des solutions diluées. Comme les groupes ionisables sont absents, la solubilité dans l'eau et la qualité du solvant semblent être directement liés à la densité de liaisons hydrogène (eau-galactomannanes) fournie par les groupements de galactoses latéraux [30]. Les résidus galactopyranoses représentent les parties hydrophiles du galactomannane. Plus le degré de substitution en galactose est élevé, plus la solubilité dans l'eau des galactomannanes est importante [8 ; 33]. Les galactomannanes de DS_{Gal} faibles à intermédiaires ($< 0,4$) sont constitués de chaînes qui affichent une solubilité partielle qui dépend de la valeur exacte de DS_{Gal} [30]. Les galactomannanes de caroube font partie de cette catégorie et sont généralement considérés comme partiellement solubles [10], voire faiblement à basse température [26]. Les zones non substituées en galactose sont le siège d'interactions intra- et inter-moléculaires générées par la présence de ponts hydrogènes entre ces zones conduisant, dans les cas extrêmes à l'agrégation et à la précipitation [26 ; 80]. La présence de groupements galactosyls ne jouerait donc pas uniquement le rôle de « partie hydrophile », elle pourrait simplement favoriser la solubilisation en empêchant la formation de liaisons coopératives entre les segments de mannose. Certains constituants d'une gomme de caroube vont donc se dissoudre directement dans de l'eau froide, mais une dissolution totale accompagnée d'une viscosité importante nécessite un long trempage à haute température [30] ou une forte agitation à haute température [8].

6.1.2. L'impact de la température sur la solubilisation

La température de solubilisation va influencer également la structure et les propriétés de la gomme. Ainsi, approximativement la moitié d'une gomme de caroube brute est soluble après 2 heures d'agitation à 5°C [32]. Le rendement d'extraction augmentera ensuite de façon linéaire avec la température pour atteindre 85% - 90% à 85°C (figure 7). Toutefois, la gomme de caroube purifiée est plus soluble que la gomme brute [9]. En effet, la purification permet l'élimination des composés insolubles et la gomme purifiée devient totalement soluble avec la température (98% contre 89% pour la gomme non clarifiée).

Plusieurs études montrent que le DS_{Gal} est inversement lié aux températures de solubilisation (figure 8) : les échantillons solubilisés à des températures de plus en plus hautes contiennent de moins en moins de galactose [27 ; 28 ; 34-36 ; 71]. A l'inverse, ceux dissous à froid contiennent le plus de galactose [32]. Un échantillon soluble à haute température possède également un nombre plus important de régions non-substituées que la gomme brute dont il est issu [81].

Il existe également une tendance à obtenir de plus hautes masses moléculaires (M_w) par chromatographie d'exclusion stérique couplée à une triple détection, lorsque la température de dissolution augmente (figure 9) [32]. Les composants polysaccharidiques qui se dissolvent avec une augmentation progressive de la température possèdent des chaînes de plus en plus longues, de l'ordre de 1 000 000 Daltons, qui contiennent également moins de galactose [31]. Ils fournissent donc une contribution positive à la masse moléculaire globale. Par conséquent, une gamme assez large de valeurs peut être observée, dans le même matériel, selon la température de dissolution [32]. De même, par méthode chimique, certains auteurs ont estimé, dans les mêmes conditions, la masse moléculaire d'une gomme de caroube solubilisée à froid à 150 000 Daltons et celle solubilisée à chaud à 650 000 Daltons [82].

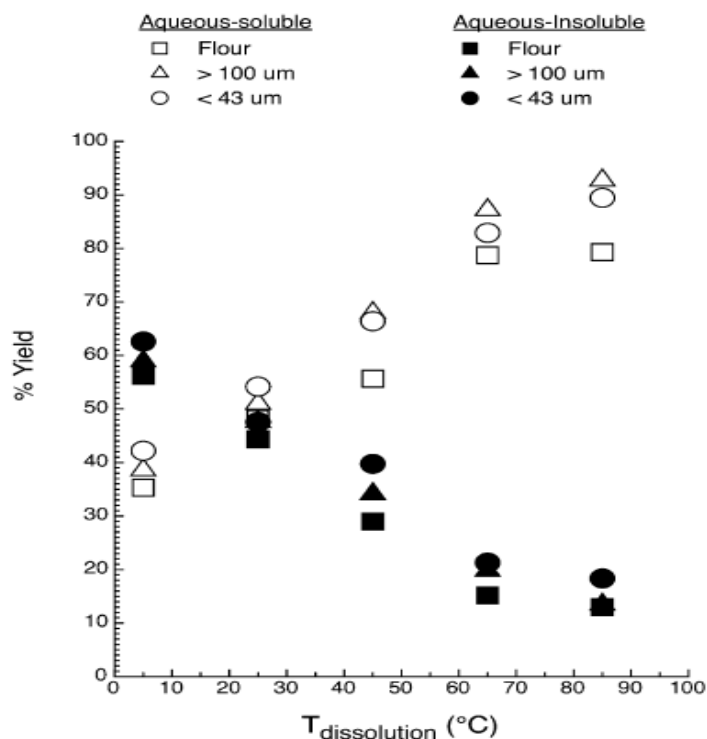


Figure 7. Influence de la température sur la solubilité, après 2 heures de mise en solution, pour de la gomme brute et des particules de tailles différentes [32]. Avec l'autorisation d'Elsevier. *Figure 7: Influence of temperature on solubility, after 2 hours of solubilization, on crude gum and particles of different sizes [32]. With the permission of Elsevier.*

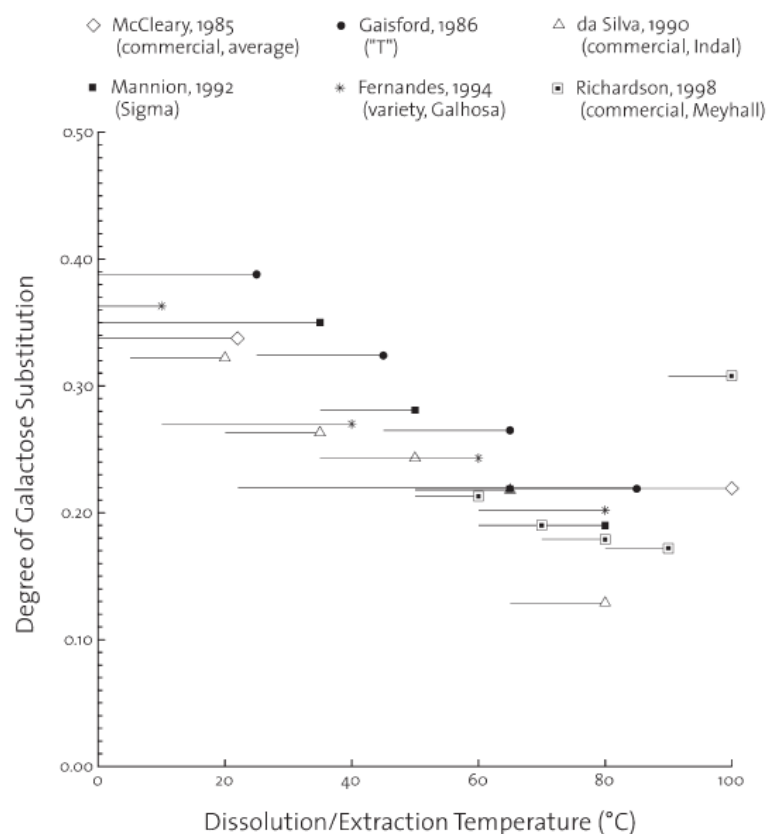


Figure 8. Degré de substitution en galactose de fractions de galactomannanes obtenues sur une large source de gomme de caroube, parfois par fractionnement [30]. Avec l'autorisation d'Elsevier. *Figure 8: Degree of galactose substitution of galactomannans fractions obtained on a wide source of locust bean gum, sometimes by splitting [30]. With the permission of Elsevier.*

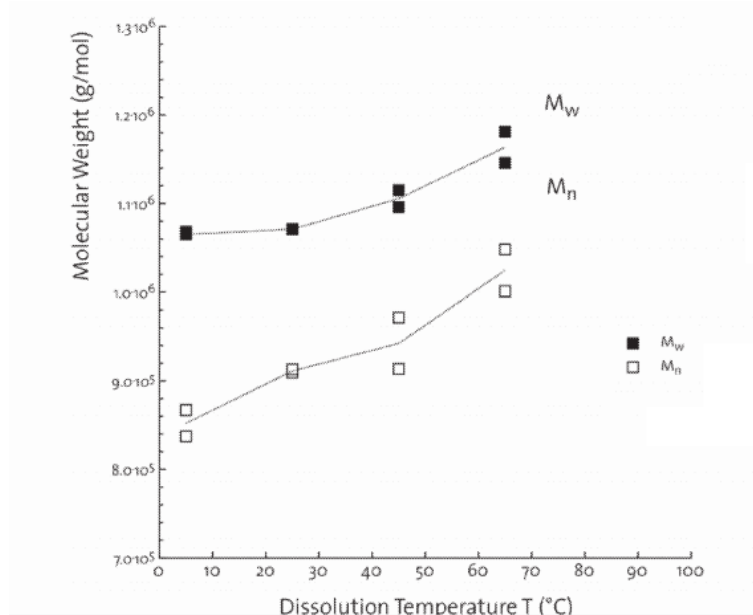


Figure 9. Poids moléculaire (déterminé par SEC) de fractions de gomme de caroube commerciale, solubilisée entre 5 °C et 65 °C [31]. Avec l'autorisation d'Elsevier. *Figure 9: Molecular weight (determined by SEC) of commercial carob gum fractions, solubilized between 5 °C and 65 °C [31]. With permission of Elsevier.*

6.1.3. Le fractionnement de la gomme de caroube

Les propriétés de solubilité de la gomme de caroube peuvent donc être utilisées pour la séparer en fractions de structure fine différentes. Plusieurs auteurs proposent de fractionner la gomme de caroube en jouant sur la température de solubilisation en milieu aqueux, sans longue préparation des échantillons [9 ; 34 ; 37 ; 43]. Le pouvoir de solvation de l'eau augmente avec la température, fournissant un moyen de fractionner le polysaccharide original. Ainsi, comme dans les solutions de polymères synthétiques, l'extraction isotherme génère une fraction polysaccharidique avec des distributions étroites de masses moléculaires et de composition chimique [31]. Les fractions de gomme de caroube générées présenteront, selon la température de travail, une gamme de rapports M/G assez large (2,5 à 5) autour du rapport moyen de la gomme de caroube brute (4) [34]. Il en va vraisemblablement de même pour la masse moléculaire et la distribution des substituants. En réalité, la tendance sera la même que celle observée lors de la

variation de la température de dissolution, mais avec un caractère plus marqué. Les portions issues d'un fractionnement possèdent une distribution en galactomannanes plus étroite que celle de la gomme brute. Deux techniques de fractionnement sont principalement recensées dans la littérature. (A) La première (intégrale) se réalise de la même manière que l'étape de clarification d'un procédé industriel de purification de la gomme de caroube. La farine brute d'endosperme de caroube est dissoute à des températures données et rigoureusement contrôlées puis les fractions solubles et insolubles à ces températures sont séparées par centrifugation. Enfin, le surnageant soluble sera ensuite précipité par un volume d'éthanol afin de récupérer la fraction spécifique [9 ; 34 ; 37]. Une étude met toutefois en évidence le fait que le volume d'éthanol utilisé influencera la composition de la fraction récoltée [43]. En effet, pour une température de solubilisation donnée, un surnageant d'après centrifugation donnera une gomme contenant une proportion croissante de galactose au fur et à mesure que la quantité d'éthanol utilisée lors de la précipitation augmente. L'adjonction de grands volumes d'éthanol permet donc de précipiter une fraction plus soluble de la gomme (car plus riche en galactoses latéraux). (B) La seconde, une technique par épuisement (soustractive), consiste à réextraire successivement le même échantillon dans des volumes d'eau de températures croissantes, pour générer les fractions suivantes, jusqu'à ce que plus aucune matière supplémentaire ne puisse être extraite [9 ; 30 ; 36 ; 83]. Elle donne également des fractions de caractéristiques plus marquées que dans le premier cas de fractionnement, car la matière récupérée correspond à celle possédant les caractéristiques structurales la rendant soluble dans une gamme étroite de température. En utilisant la première technique de fractionnement, de grandes quantités de galactomannanes solubles à de plus basses températures viennent enrichir la fraction concernée. Une autre technique de fractionnement consiste en une solubilisation de la gomme de caroube à une température de 95°C suivie d'une précipitation par ajout d'un gradient de sulfate d'ammonium de 20, 30, 45, 80 et 100% de saturation [68]. Les polymères contenant de hautes masses moléculaires, un faible degré de substitution et une répartition de type blocs précipitent à de faibles degrés de saturation. Cette fraction générera les solutions les plus visqueuses. La structure fine et la viscosité semblent donc étroitement liées.

6.2. Les propriétés visqueuses, viscoélastiques et l'autoassociation des galactomannanes de caroube

6.2.1. La viscosité intrinsèque

En solution diluée, la viscosité spécifique η_{sp} d'une solution de polymère est une grandeur sans dimension définie de la manière suivante : $\eta_{sp} = \frac{\eta_0 - \eta_s}{\eta_s}$.

η_s est la viscosité du solvant en l'absence de polymère dissous et η_0 la viscosité de la solution contenant une concentration C de polymère dissous. De la viscosité spécifique, il est possible de déterminer la viscosité intrinsèque $[\eta]$:

$[\eta] = \lim_{C \rightarrow 0} \left(\frac{\eta_{sp}}{C} \right)$, qui possède la dimension de l'inverse d'une concentration.

Expérimentalement, la viscosité intrinsèque $[\eta]$ peut être estimée en réalisant des mesures de viscosité à basses concentrations en polymères. Ensuite, une extrapolation est réalisée, en faisant tendre C vers 0, à l'aide des équations de Huggins : $\eta_{sp}/C = [\eta] + k'[\eta]^2 C$ et Kraemer : $(\ln \eta_r)/C = [\eta] + k''[\eta]^2 C$, où η_r est la viscosité relative ($\eta_r = \eta_0/\eta_s$) et k' et k'' , des constantes [25].

Dans des conditions de régime « dilué » (figure 10a), la viscosité intrinsèque $[\eta]$ va être influencée par la masse moléculaire, le DS_{Gal} et le motif de distribution des galactoses. La relation de Mark-Houwink exprime ainsi une relation de proportionnalité entre viscosité intrinsèque $[\eta]$ et masse molaire moyenne viscosimétrique: $[\eta] = KM_w^\alpha$. K ($\text{cm}^3 \cdot \text{mol}^{1/2} / \text{g}^{3/2}$) est une mesure de la rigidité d'une chaîne de polymère [35] et α , l'exposant de Mark-Houwink, est égal à 0,8 dans le cas de la gomme de caroube [84]. Un accroissement de masse moléculaire générera donc une viscosité intrinsèque plus importante. Ce modèle un peu simpliste a été revu par certains auteurs pour tenir compte du DS_{Gal} . Plus ce dernier sera important et plus la viscosité intrinsèque $[\eta]$ sera faible [7 ; 1 ; 27 ; 28]. Il a également été adapté pour intégrer le volume hydrodynamique occupé par unité de masse. Dans ce modèle, la viscosité intrinsèque $[\eta]$ est proportionnelle au cube du rayon de giration [25], lui-même lié à la distribution des galactoses latéraux.

Lorsque la concentration du milieu augmente, la concentration critique C^* (occupation totale du volume par les macromolécules, figure 10b) est franchie et le régime est dit : « semi-dilué » (figure 10c). Dans une telle situation, un nouveau phénomène susceptible d'influencer la viscosité intrinsèque $[\eta]$ apparaît : l'interpénétration des chaînes macromoléculaires. Il conduit à la création de recouvrements « physiques » plus ou moins denses [79]. Le développement des enchevêtrements ne peut toutefois se faire que si « la concentration est suffisante pour obliger les pelotes individuelles à s'interpénétrer » [85 ; 86]. Dans de telles conditions, certains auteurs indiquent que la viscosité spécifique initiale théorique d'une solution de polymère ne dépend que de la concentration et du cube de la masse moléculaire [87]. Pourtant, les galactomannanes de caroube présentent une viscosité spécifique supérieure à celles des prédictions théoriques, des autres polymères et même des autres polysaccharides de conformation pelote aléatoire.

Ce phénomène s'explique par la présence d'interactions plus spécifiques entre les macromolécules, en plus des recouvrements physiques non-spécifiques. Ces interactions sont appelées hyper-enchevêtrements [76]. Ces phénomènes contribuent fortement au développement de la viscosité des galactomannanes et expliquent, par rapport à d'autres polymères, la plus forte dépendance de la viscosité à la concentration.

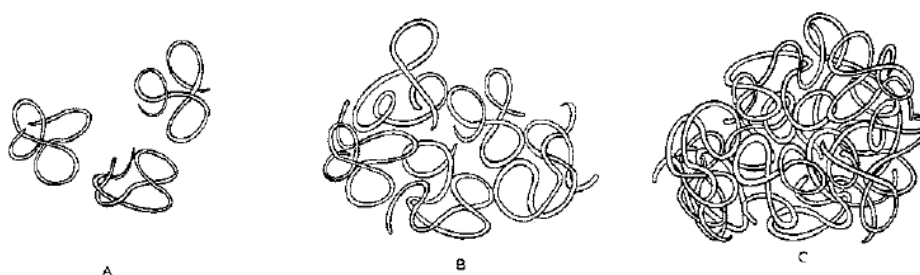


Figure 10. Illustration de différents régimes de concentration : A, solution diluée avec $c < c^*$ (molécules individuelles) ; B, molécules montrant un début de recouvrement $c \approx c^*$; C, molécules enchevêtrées $c > c^*$ [84]. Avec l'autorisation d'Elsevier. *Figure 10: Illustration of different concentration regimes : A, dilute solution with $c < c^*$ (individual molecules) ; B, molecules showing incipient overlap with $c \approx c^*$; C, entangled molecules with $c > c^*$ [84]. With permission of Elsevier.*

Les hyper-enchevêtrements observés résultent de phénomènes d'agrégation intermoléculaire entre les chaînes de galactomannanes. En effet, une baisse réversible de la viscosité spécifique de la gomme de caroube est observée lorsque le caractère alcalin du milieu augmente. « Les hydroxyles des polysaccharides neutres sont ionisés à un pH élevé. Cela génère l'apparition de répulsions électrostatiques entre les constituants des chaînes » [89]. L'agrégation moléculaire est également influencée par les caractéristiques structurales de la gomme [50]. Une étude a ainsi montré qu'en augmentant le rapport M/G, par sélection de variétés de caroubiers différents, la viscosité intrinsèque augmentait également progressivement [24]. Des fractions pauvres en galactose généreront donc une viscosité intrinsèque élevée.

Cette constatation a également pu être établie sur des galactomannanes d'origines botaniques différentes. En réalité, cette analyse est un peu incomplète car il est fortement probable que la quantité de régions « lisses » ait plus d'importance dans la viscosité en solutions semi-diluées que le simple rapport M/G [1]. D'autres auteurs ont ainsi déterminé en régime semi-dilué la viscosité spécifique d'échantillons de caroube fractionnés à haute et basse températures [34]. La fraction extraite à chaud présente une viscosité spécifique plus importante que celle extraite à froid car elle possède une quantité de zones « lisses » plus importantes. D'autres études mettent également en évidence un accroissement de la viscosité intrinsèque de solutions de gomme de caroube lorsque le contenu en zones lisses augmente [68 ; 80]. Le phénomène d'agrégation moléculaire est ainsi d'autant plus marqué que le polysaccharide possède des séquences non-substituées (lisses) capables d'intervenir dans des associations intermoléculaires (figure 11) [81].

Ces zones, faiblement substituées en galactose, deviennent évidemment de plus en plus abondantes au fur et à mesure que le rapport M/G augmente [35 ; 89]. Les phénomènes d'agrégation et l'hyper-enchevêtrement qui en résulte seraient, par conséquent, dus à des interactions chaîne-chaîne subvenant entre les segments de mannanes non-substitués en galactose [25]. Les zones non-substituées des chaînes de galactomannanes seraient donc à la base des interactions intra-moléculaires (la molécule se replie alors sur elle-même) et des associations intermoléculaires (la molécule s'associe à une autre molécule). Le phénomène qui contrôle l'agrégation de ces polymères neutres hydrosolubles trouverait son origine dans l'établissement de ponts hydrogène coopératifs entre les zones des chaînes dépourvues de résidus galactose [26].

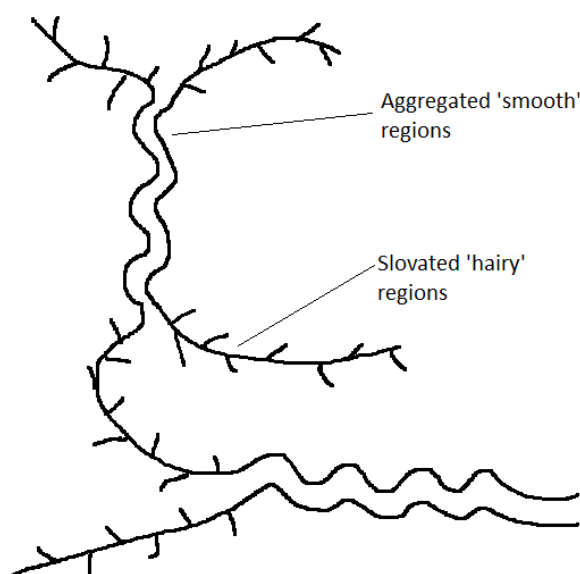


Figure 11. Structure proposée pour les gels de galactomannanes. Les régions non-substituées de la chaîne de mannane sont associées, comme dans un état solide, pour former des jonctions interchaînes, tandis que les régions substituées sont fortement hydratées, comme en solution, et empêchent la précipitation complète. Adapté d'après [89]. *Figure 11: Proposed galactomannan gels structure. Non-substituted region of mannan chain are associated, as in a solid state to form interchain junctions, while the substituted regions are highly hydrated, as in solution, and inhibit the complete precipitation. According to [89].*

6.2.2. La viscosité dynamique

Pour caractériser le comportement visqueux de polysaccharides, la viscosité dynamique η (Pa.s) des solutions semi-diluées est également étudiée. Ces mesures se réalisent au rhéomètre. Les galactomannanes en solution présentent un comportement de « liquides rhéofluidifiants, c'est-à-dire que la viscosité apparente (Pa.s) diminue lorsque la vitesse de cisaillement (s^{-1}) augmente. En effet, sous la contrainte de cisaillement imposée, les macromolécules de galactomannanes se déchevêtrent plus ou moins rapidement suivant la densité des enchevêtrements et la force des interactions pour s'orienter dans la direction du flux. Cette réorganisation

des macromolécules se traduit par une baisse de la viscosité » [76 ; 80]. L'effet rhéofluidifiant est réversible [59].

Certains auteurs n'observent toutefois pas de diminution franche de la viscosité apparente dans la région de faibles vitesses de cisaillement. Ce pallier est suivi d'une chute rapide de viscosité apparente dans les régions de plus hautes vitesses de cisaillement (figure 12 A). Ils en concluent donc que les galactomannanes de caroube possèdent un comportement typiquement pseudoplastique [37 ; 75]. Plusieurs paramètres influencent la viscosité dynamique η de solutions semi-diluées. L'augmentation de la concentration en galactomannanes de caroube d'une solution augmentera la viscosité initiale du liquide. Elle accentuera également le caractère rhéofluidifiant de la solution [76]. Outre l'effet de la concentration, la viscosité apparente d'une solution semi-diluée reste liée à la structure moléculaire, qui influence les possibilités d'interactions [25 ; 26 ; 86]. La présence de zones lisses influence donc le comportement visqueux. Plus celles-ci sont présentes, plus la viscosité apparente initiale de la solution sera importante et plus le caractère rhéofluidifiant sera marqué [68]. Cela démontre une fois de plus le rôle crucial joué par les zones peu substituées dans les interactions moléculaires.

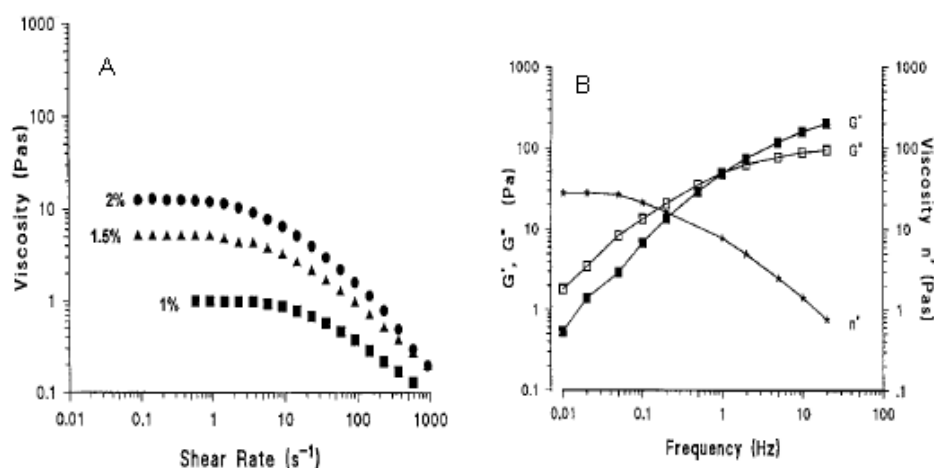


Figure 12. A) courbe d'écoulement de concentrations croissantes en galactomannanes et B) spectre mécanique de solutions de galactomannanes de caroube, pris à 25 °C [75]. Avec l'autorisation d'Elsevier. *Figure 12: steady shear viscosity profiles of increasing galactomannans concentrations and B) mechanical spectrum of carob galactomannans solutions, measured at 25 °C [75]. With permission of Elsevier.*

Les solutions visqueuses de galactomannanes ne sont affectées que légèrement par le pH, les sels et les variations thermiques [9 ; 58]. La viscosité apparente d'une solution reste donc relativement constante sur une gamme de pH de 1 à 10,5 [1]. Néanmoins, un maximum de viscosité est observé à pH 5 [24]. Toutefois, une dégradation des polymères peut apparaître dans conditions hautement acides ou alcalines, surtout si elles sont chauffées [1]. La viscosité apparente évolue tout de même sur une large gamme de température. Elle est gouvernée, lors d'une montée progressive de la température, par trois facteurs : (A) une diminution réversible de la viscosité apparente de la gomme de caroube avec l'augmentation de la température, due à une augmentation des mouvements macromoléculaires (20-40 °C) ; (B) une augmentation de la viscosité apparente due à une augmentation de la solubilisation (40-70 °C) ; (C) Une perte de viscosité apparente due à la diminution de masse moléculaire, résultant d'une dégradation thermique (70-120 °C). Lors du refroidissement, la gomme de caroube retrouve une viscosité apparente plus élevée que sa viscosité initiale [8]. La température de préparation de la solution revêt donc une importance capitale lors des mesures de viscosité dynamique. Certains auteurs montrent ainsi que la viscosité apparente d'une même gomme peut passer, dans certains cas, du simple au double, selon qu'elle est solubilisée à 25 ou 80 °C [90]. Ces données sont évidemment à interpréter sous l'angle des propriétés de solubilité. Une augmentation de la température permet de solubiliser davantage de polymères riches en « zones lisses », qui peuvent s'agréger et s'enchevêtrer, formant ainsi un réseau plus dense et donc plus visqueux.

6.2.3. Les propriétés viscoélastiques

Les solutions macromoléculaires semi-diluées peuvent également être analysées au rhéomètre sur base de leurs propriétés viscoélastiques. Ces dernières sont plus ou moins marquées du fait des interactions se produisant entre chaînes. C'est une des voies principales utilisées pour mettre en évidence les enchevêtrements. Le spectre mécanique d'une solution de gomme de caroube est présenté à la figure 12B. On peut y observer que la gomme de caroube en solution semi-diluée est un fluide typiquement viscoélastique. Le module visqueux G'' (Pa) est plus important que le module élastique G' (Pa) à de basses fréquences d'oscillations, tandis que l'inverse est observé à de plus hautes fréquences (figure 12 A). Le comportement viscoélastique d'une solution est également influencé par la structure des polymères. A concentration égale, un déplacement du point d'intersection vers les plus basses fréquences est observé lorsque la masse moléculaire moyenne augmente. Cela signifie que les chaînes plus longues ont tendance à générer plus vite un

comportement élastique, car les enchevêtrements se dissocient moins facilement [75]. D'autre part, une étude réalisée sur des gomme de caroubes non-purifiées, indique que le module élastique semble être d'autant plus important que le rapport M/G de la gomme de caroube l'est également [28]. La tendance est la même pour une gomme fractionnée à différentes températures : des températures élevées de solubilisation génèreront des rapports M/G plus importants et un module élastique G' accru [27]. Par ailleurs, une étude montre qu'une fraction de gomme de caroube contenant peu de galactose et beaucoup de « zones lisses » génère un spectre mécanique au caractère élastique bien plus marqué, même à de basses fréquences [68]. Ce comportement serait également dû aux interactions intermoléculaires entre les régions non substituées de la chaîne de mannane qui génèrent la formation d'un réseau plus dense. La concentration influence toutefois fortement les propriétés viscoélastiques d'une solution de galactomannanes. Il est important d'en tenir compte lors de la comparaison de résultats. Ainsi, l'augmentation de la concentration en gomme de la solution va générer la transition d'un comportement plus visqueux vers un comportement plus élastique [76 ; 85] et donc, un déplacement du point d'intersection vers des fréquences plus basses. Cette observation est logique car l'augmentation de la concentration favorise l'apparition d'un réseau interpénétré et enchevêtré, difficile à dissocier, et donc au comportement élastique.

6.2.4. La formation d'hydrogels

L'auto-association des galactomannanes peut également être étudiée par gel-dégel. En effet, une solution visqueuse de gomme de caroube peut former un hydrogel contracté lorsqu'elle est soumise à plusieurs cycles de congélation-décongélation [69 ; 89 ; 91]. L'analyse calorifique différentielle (DSC) et l'analyse thermomécanique (TMA) indiquent que les hydrogels de caroube sont thermiquement irréversibles et aucune transition gel-sol n'est observée [92]. Il est supposé que la formation des hydrogels résulte d'une agrégation des chaînes, entre les régions de mannoses linéaires non-substitués. Il semble, en effet, y avoir une bonne corrélation entre la longueur moyenne des zones non-substituées (estimées par simulation informatique) et le pourcentage de précipitation sous forme d'hydrogel, obtenu par un traitement gel-dégel [63 ; 81]. Ces résultats sont toutefois à prendre avec prudence car la détermination du précipité repose sur une centrifugation à température ambiante. Elle n'est donc pas le seul fait de l'auto-association mais aussi celui des propriétés de solubilité. Ces résultats sont cependant corroborés par une étude de RMN en phase solide qui démontre, dans de tels gels, la plus grande mobilité des segments composés de galactose et de mannose par rapport

à ceux contenant du mannose seul [69]. Ces derniers seraient donc impliqués dans les jonctions.

Ainsi, les résultats caractérisant le comportement de la gomme de caroube en solutions diluées et semi-diluées, indiquent clairement que la taille des molécules et le degré de substitution ne sont pas les seuls paramètres influençant la viscosité, la distribution des résidus D-galactosyl sur la chaîne principale y joue également un rôle prépondérant.

6.3. Formation de gels par association à d'autres polyholosides

L'association de galactomannanes avec d'autres molécules est utilisée depuis longtemps en industrie. Majoritairement, il s'agit d'autres polysaccharides tels que l'amidon [2 ; 17], l'agar, les carraghénanes ou le xanthane [1]. Les protéines sont toutefois occasionnellement utilisées [93]. L'intérêt de cette association est lié au fait que la gomme de caroube est moins coûteuse que les autres saccharides avec lesquels elle interagit à des degrés divers. Par cette technique, il est possible de former des gels de force spécifique pouvant également avoir des propriétés originales pour certaines applications. L'étude de la formation de ces gels apporte de précieuses informations sur la relation structure moléculaire – fonctionnalité des galactomannanes et consiste par conséquent en un moyen de détermination de la structure « fine » de la gomme de caroube. En réalité, ici aussi, la concentration et la répartition statistique des groupements galactose latéraux vont contrôler le comportement de solubilité et les propriétés d'interactions avec les autres saccharides [31].

Le modèle le plus étudié d'interaction entre galactomannanes et un autre polysaccharide est le gel qu'il forme avec le xanthane. Le comportement rhéologique d'une solution de xanthane a été attribué à la structure moléculaire ordonnée adoptée sous la majorité des conditions environnementales. A haute température et faible force ionique, les molécules de xanthane sont vraisemblablement présentes dans une conformation désordonnée, mais en refroidissant, une transition désordre-ordre prend place et une conformation hélicoïdale rigide est adoptée (figure 13). Dans de l'eau distillée, cette température de transition conformationnelle (T_m ; °C) a été déterminée à 50 °C, mais peut varier avec la force ionique du milieu [36]. Le xanthane seul est incapable de former un gel. Par contre, les xanthanes et les galactomannanes de caroube sont capable

d'interagir en solution pour donner une augmentation synergétique significative de la viscosité ou de la force d'un gel [89]. Dans une telle structure, la microscopie de polarisation semble indiquer que les molécules de xanthanes ne sont concentrées dans des zones spécifiques, mais uniformément distribuées dans le milieu [94]. L'accroissement du degré d'interaction avec le xanthane évolue linéairement et de façon inversement proportionnelle au contenu en D-galactose [26 ; 95], des galactomannanes de caroube fortement substitués se révélant même incapables d'interagir avec le xanthane [68]. De même, une gomme de guar de rapport M/G 2:1 ne formera jamais de gel avec du xanthane, quelle que soit sa concentration [96]. Cela semble indiquer que les sites d'interaction entre xanthane et galactomannanes sont les régions les moins substituées. Partant de ce constat, de nombreux modèles ont, dès lors, été proposés pour tenter d'expliquer les mécanismes d'interaction.

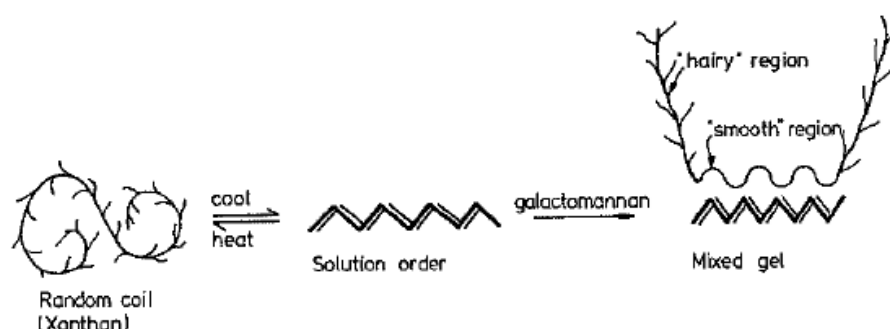


Figure 13. origine moléculaire des interactions du xanthane avec les galactomannanes. Les zones de jonctions pourraient être formées par des associations coopératives entre des régions de la chaîne de mannane et la structure native du xanthane [84]. Avec l'autorisation d'Elsevier. *Figure 13: molecular origin of xanthan interactions with galactomannans. The junction zones could be formed by cooperative associations between parts of the mannan chain and xanthan native structure [84]. With permission of Elsevier.*

Un modèle de base propose une association entre la chaîne principale de l'hélice de xanthane et les régions non-substituées du galactomannane (figures 13 et 14) [89 ; 95]. Ce modèle découle de l'observation expérimentale d'une diminution de l'ampleur de l'interaction avec une augmentation de la substitution en galactose et par l'apparente capacité des galactomannanes à stabiliser les hélices de xanthane. Ce modèle a été adapté pour tenir compte des interactions constatées entre xanthane et certains galactomannanes hautement substitués en galactose [29 ; 97]. Il a donc été

suggéré que les régions où plusieurs substituants sont situés du même côté de la chaîne de mannose sont également capables d'intervenir dans les interactions avec les xanthanes [63]. Les interactions ne nécessitent donc plus uniquement de longues sections de résidus mannoses non-substitués continus. Les « zones de jonction » peuvent également se situer sur des sections plus courtes où tous les résidus galactosyls sont situés du même côté de la chaîne principale (figure 14). L'existence de « zones de jonction » a pu être établie dans des gels refroidis après chauffage, lors d'études de diffraction aux rayons X [98]. Les jonctions ne peuvent toutefois s'établir que si le xanthane est dans une conformation désordonnée (non-hélicoïdale). Cependant, lors de l'étude de mélanges entre du xanthane et des galactomannanes de haut rapports M/G (5), une association des polysaccharides à des températures sous T_m a été observée, c'est-à-dire lorsque le xanthane est en conformation ordonnée [99]. Les auteurs suggèrent que les interactions ont lieu entre la chaîne de mannane de la gomme de caroube et certaines sections désordonnées du xanthane hélicoïdal ordonné. Une autre étude basée sur l'utilisation de galactomannanes hautement substitués en galactose a montré qu'ils pouvaient également interagir avec du xanthane à des températures de gélification pourtant inférieures à T_m [29].

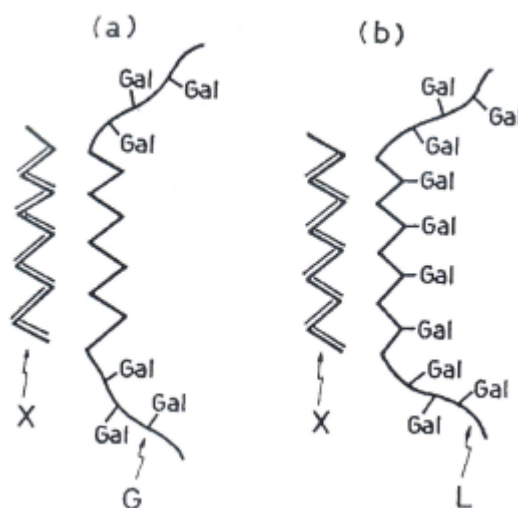


Figure 14. Modèle proposé pour l'association de xanthane et A) de gomme de caroube ; B) de galactomannane de *Leucaena leucocephala* [97]. Avec l'autorisation d'Elsevier. *Figure 14: Proposed model for the combination of xanthan and A) locust bean gum B) galactomannan of Leucaena leucocephala* [97]. With permission of Elsevier.

En réalité, les interactions entre xanthanes et galactomannanes pourraient être dues à deux mécanismes distincts. Le premier, prenant part à température ambiante, donne des gels faibles et cassants, et est relativement indépendant du contenu en galactose du galactomannane. Le second requiert des températures élevées pour former des gels forts et hautement dépendants de la composition en galactose du galactomannane. [36]. Dans le cas du premier mécanisme, le mélange à froid des solutions de polysaccharides ne libérerait pas suffisamment de sites de liaisons sur les chaînes de xanthane, de sorte que tous les galactomannanes – faiblement ou fortement substitués – possèdent suffisamment de régions « lisses » pour occuper tous les sites de liaisons du xanthane. Selon d'autres auteurs, les deux mécanismes sont capables de coexister, du moins pour des galactomannanes de rapport M/G = 3 et 3,5, tout en étant influencés par la concentration saline du milieu [100]. La formation de gels à plus haute température que T_m est donc directement reliée au rapport M/G et à la distribution des galactoses sur les chaînes de mannose. Des travaux plus récents démontrent ainsi qu'il existe une corrélation entre le module visqueux G' (déterminé au rhéomètre) d'un gel mixte gomme de caroube/xanthane et le nombre de résidus mannose successivement non-substitués [101]. La même étude indique également une augmentation du module visqueux G' avec l'accroissement de la masse moléculaire. Le comportement d'association au xanthane est donc fortement lié à la structure fine du galactomannane. La présence de zone « lisses » apparaît toutefois comme le critère prépondérant qui favorise l'apparition de gels « forts » entre xanthane et galactomannanes. Les propriétés rhéologiques du gel sont également influencées par la composition du xanthane en acétates et en pyruvates [102].

Les galactomannanes sont également susceptibles de former des gels avec les carraghénanes, d'autant plus que le rapport M/G est important. Les études menées sur le sujet s'accordent également sur le fait que les zones à faible contenu en galactose ou « lisses » sont impliquées dans la jonction aux κ -carraghénanes. Les galactomannanes qui en sont pourvus sont donc plus fortement connectés aux κ -carraghénanes et forment des gels plus forts [1 ; 28 ; 83 ; 103 ; 104 ; 105 ; 106]. Les mêmes constatations découlent aussi de l'étude des gels galactomannanes/agarose [1]. Enfin, il est à signaler que le degré d'interaction aux protéines est également inversement proportionnel au DS_{Gal} [102].

7. Conclusions

Le procédé d'extraction et de purification utilisé lors de la fabrication de la gomme de caroube (ou son fractionnement ultérieur) va conditionner les caractéristiques de celle-ci et, par conséquent, ses potentialités d'applications. Lors d'un tel procédé, la température de solubilisation des polysaccharides est le paramètre critique à contrôler (tableau 1).

Une température relativement basse sélectionnera des galactomannanes de faibles masses moléculaires et de contenu en galactose important. Ces fibres ont un caractère hydrophile plus marqué. A contrario, une température de travail plus importante permettra de solubiliser des galactomannanes plus longs et très pauvres en galactose, qui apporteront leurs contributions aux caractéristiques globales de la gomme obtenue. Celle-ci possédera une masse moléculaire moyenne plus importante, un degré de substitution en galactose plus faible, ainsi qu'un motif de distribution du galactose présentant plus de zones lisses. Ces deux types de gomme présenteront des propriétés physiques différentes en solutions aqueuses.

Les gommes « à chaud » nécessitent une montée en température pour atteindre la solubilisation. Elles présenteront une conformation en solutions aqueuses de type pelote, plutôt étendue, induite par la présence de nombreuses zones lisses. Leurs volumes hydrodynamiques sont donc plus importants, ce qui génère une viscosité intrinsèque plus importante. Leurs structures favorisent également, en régime semi-dilué, les phénomènes d'agrégaions moléculaires et les hyper-enchevêtrements qui en résultent. Après le chauffage nécessaire à la mise en solution, la viscosité initiale de telles solutions sera donc plus importante et les caractères rhéofluidifiants et élastiques plus marqués que ceux de solutions de gomme « à froid ». La présence de zones lisses accroît les possibilités de formation de gels par association à d'autres saccharides, à travers de nombreuses zones de jonction. Après une phase de montée en température, les gels obtenus seront relativement forts et solides.

Les gommes « à froid » présentent l'avantage d'être solubles en solution aqueuses, même à de faibles températures. Bien que leurs caractéristiques structurales leur confèrent une conformation plus enroulée et à fortiori une viscosité intrinsèque plus faible, elles génèrent toutefois des solutions directement visqueuses, sans étapes de chauffage préalables. Leurs structures plus faiblement pourvues en zones lisses limitent les possibilités d'agrégaion. Les solutions préparées avec de telles gommes

présentent donc, même après chauffage, des viscosités plus faibles, un caractère rhéofluidifiants moins marqué et un comportement plus visqueux qu'élastique. Leurs structures globalement plus « hérissées » limitent, mais sans les exclure, les possibilités de formation de gels mixtes.

Tableau 1. Impact de la température de purification/fractionnement sur la relation structure-fonction des galactomannanes de caroube (méthode soustractive)^a.

	Type de gomme			Auteurs
	<i>Brute</i>	<i>Basse température</i> ($\approx 25^{\circ}\text{C}$)	<i>Haute température.</i> ($\approx 80^{\circ}\text{C}$)	
Structure	Rapport M/G = 4,17	Rapport M/G = 2,8	Rapport M/G \approx 4-5	[9 ; 34 ; 36]
	M _n (méthode chimique) = 300 000 Da	M _n (méthode chimique) = 150 000 Da	M _n (méthode chimique) = 650 000 Da	[1]
	Nombre de résidus Mannoses successivement non-substitués = 6,4	/	Nombre de résidus Mannoses successivement non-substitués = 9,4	[81]
	Viscosité intrinsèque $[\eta]$ de solutions diluées = 15,3	Viscosité intrinsèque $[\eta]$ de solution dilués = 12,4	Viscosité intrinsèque $[\eta]$ de solutions diluées = 16,0	[84]
	/	η_{sp} d'une solution concentrée de galactomannane \approx 8	η_{sp} d'une solution concentrée de galactomannane \approx 31	[54]
Propriétés	Module élastique (G') d'un gel mixte : galactomannane-xanthane = 505 Pa et galactomannane-carraghénanes = 716 Pa	Module élastique (G') d'un gel mixte : galactomannane-xanthane = 199 Pa et galactomannane-carraghénanes = 455 Pa	Module élastique (G') d'un gel mixte : galactomannane-xanthane = 710 Pa et galactomannane-carraghénanes = 827 Pa	[27 ; 28 ; 84]]
	Précipitation (%) après un cycle gel-dégel = 37 %	/	Précipitation (%) après un cycle gel-dégel = 88 %	[81]

^a Des résultats similaires sont obtenus par la méthode intégrale, mais sont moins contrastés.

Dans le cas des galactomannanes de caroube, structure chimique et propriétés physiques sont donc étroitement liées. Si le degré de substitution en galactose et la masse moléculaire ont un impact indéniable sur les propriétés de la gomme, le motif de distribution des substituants galactosyles semble cependant être le paramètre qui

conditionnera le plus le comportement du polymère en solution aqueuse. L'impact des zones non-substituées sur la solubilisation n'a pas été abondamment étudié. Il est toutefois admis que la présence de galactose limite l'agrégation inter- et intramoléculaire ainsi que la précipitation. Les fractions riches en zones lisses seront donc mises en solution avec plus de difficulté et nécessiteront probablement une montée en température pour atteindre une solubilisation complète. La mise en solution est une étape primordiale au développement des propriétés physiques. Une fois cet état atteint, les galactomannanes de structure en blocs présenteront cependant des capacités d'agrégaions moléculaires beaucoup plus importantes, mettant en exergue la responsabilité des zones lisses dans les interactions chaînes/chaînes. Ils développeront donc des viscosités (et viscoélasticités) nettement plus marquées. Le motif de distribution des résidus galactosyls conditionne également l'aptitude à la co-gélification, les zones lisses étant clairement impliquées également dans les zones de jonctions avec les autres polysaccharides. Sa connaissance précise permettra donc de prédire les propriétés de la gomme (ou d'une de ses fractions) et de lui cibler des applications spécifiques. Il faudrait donc, à l'avenir, cibler préférentiellement l'étude de ce paramètre, lors des études sur le comportement des galactomannanes. Le degré de substitution en galactose, si souvent cité, ne semble pas être une caractéristique suffisante. C'est une donnée utile mais incomplète.

8. Bibliographie

- [1] I. Dea, A. Morrison, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 31 (1975) 241-312.
- [2] G. Ravindran, L. Matia-Merino, G. Paracha, *Food Hydrocolloids : Characteristics, Properties and Structures*. Nova Science Publishers (2010), Inc. Hauppauge, N. Y.
- [3] J. Patmore, H. Goff, S. Fernandes, *Food Hydrocoll.* 17 (2003) 161-169.
- [4] B. Biner, H. Gubbuk, M. Karhan, M. Aksu, M. Pekmezci, *Food Chemistry* 100 (2007) 1453-1455.
- [5] Y. Kawamura, *Chemical and Technical Assessment for the 69th JECFA* (2008).
- [6] V. Davé, S. McCarthy, *J Environ. Polym. Degrad.* 5 (1997) 237-241.
- [7] J. Doublier, B. Launay, *J. Texture Stud.* 12 (1981) 151-172.
- [8] M. Kök, S. Hill, J. Mitchell, *Food Hydrocoll.* 13 (1999) 535-542.
- [9] J. Lopez da Silva, M. Goncalves, *Food Hydrocoll.* 4 (1990) 277-287.
- [10] P. Richardson, A. Clark, A. Russell, P. Aymard, I. Norton, *Macromolecule* 32 (1999) 1519-1527.
- [11] M. Williams, T. Foster, D. Martin, I. Norton, M. Yoshimura, K. Nishinari, *Biomacromolecules* 1 (2000) 440-450.
- [12] M. Yoshimura, K. Nishinari, *Food Hydrocoll.* 13 (1999) 227-233.
- [13] M. Camacho, N. Martinez-Navarrete, A. Chiralt, *Intern. Dairy J.* 15 (2005) 243-248.
- [14] P. Maletto, *United States Patent Application* 20050095336 (2005).
- [15] J. Ramirez, M. Barrera, O. Morales, M. Vazquez, *Food Hydrocolloids* 16 (2002) 11-16.
- [16] A. Jana, H. Patel, S. Pinto, J. Prajapati, *J. Food Sci. Technol.* 47(2010) 240-242.
- [17] J. BeMiller, *Carbohydr. Polym.* 86 (2001), 386-423.
- [18] P. Dakia, B. Wathelet, M. Paquot, *Food Chemistry* 102 (2007) 1368-1374.
- [19] N. Bouzouita, A. Khaldi, S. Zgouli, L. Chebil, R. Chekki, M. Chaabouni, P. Thonart, *Food Chemistry* 101 (2007) 1508-1515.
- [20] I. Vieira, F. Mendes, M. Gallao, E. de Brito, *Food chemistry* 101 (2007) 70-73.
- [21] C. Vendruscolo, C. Ferrero, E. Pineda, J. Silveira, R. Freitas, M. Jimenez-Castellanos, T. Bresolin, *Carbohydr. Polym.* 76 (2009) 86-93.

- [22] V. Prajapati, G. Jani, N. Moradiya, N. Randeria, B. Nagar, Carbohydrate Polymer 94 (2013) 814-821.
- [23] C. Marianecchi, M. Carafa, L. Di Marzio, F. Rinaldi, C. Di Meo, F. Alhaique, P. Matricardi, T. Coviello, J. Pharm. Pharmaceut. Sci. 14 (2011) 336-346.
- [24] V. Rizzo, F. Tomaselli, A. Gentile, S. La Malfa, E. Maccarone, J. Agric. Food Chem. 52 (2004) 7925-7930.
- [25] E. Morris, A. Cutler, S. Ross-Murphy, D. Rees, Carbohydr. Polym. 1 (1981) 5-21.
- [26] M. Rinaudo, Food hydrocoll. 15 (2001) 433-440.
- [27] P. Fernandes, Food control 5 (1994) 244-248.
- [28] P. Fernandes, Food chemistry 49 (1994) 367-371.
- [29] T. Bresolin, M. Milas, M. Rinaudo, J. Ganter, Int. J. Biol. Macromol. 23 (1998) 263-275.
- [30] M. Pollard, P. Fischer, Curr. Opin. Colloid Interface Sci. 11 (2006) 184-190.
- [31] M. Pollard, R. Kelly, C. Wahl, P. Fischer, B. Eder, R. Amado, Proceedings of the 4th International Symposium on Food Rheology and Structure, Zurich, Switzerland, February 19-23 (2006) 373 - 376.
- [32] M. Pollard, R. Kelly, P. Fischer, E. Windhab, B. Eder, R. Amado, Food Hydrocoll. 21 (2007) 683-692.
- [33] L. Moreira, E. Filho, Appl. Microbiol. Biotechnol. 79 (2008) 165-178.
- [34] S. Gaisford, S. Harding, J. Mitchell, T. Bradley, Carbohydr. Polym. 6 (1986) 423-442.
- [35] P. Richardson, J. Willmer, T. Foster, Foods hydrocoll. 12 (1998) 339-348.
- [36] R. Mannion, C. Melia, B. Launay, G. Cuvelier, S. Hill, S. Harding, J. Mitchell, Carbohydr. Polym. 19 (1992) 91-97.
- [37] F. Garcia-Ochoa, J. Casas, J. Sci. Food Agric. 59 (1992) 97-100.
- [38] M. Petit, J. Pinilla, Lebensm. Wiss. u.-Technol. 28 (1995) 145-152.
- [39] P. Correia, M. Martins-Loucao, Field Crops Res. 91 (2005) 1-6.
- [40] H. Neukom, in: P. Fito, A. Mulet (eds), Proceeding of the II International Carob Symposium, Valencia, Spain, 1988, p 551-555.
- [41] B. McCleary, Phytochemistry 22 (1983) 649-658.
- [42] P. Dakia, Mémoire : Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux-Belgique (2003).
- [43] W. Wielinga, in : Phillips, & Williams (eds.), Gums and stabilisers for the food industry 5, Oxford : IRL Press (1990) p 383-403.

- [44] A. Yousif, H. Alghzawi, *Food Chemistry* 69 (2000) 283-287.
- [45] M. Hefti & Co, Patent Specification 749,766, No. 14813/53 (1953).
- [46] Ind Agrícolas Levantinas, Patent specification 791.077, No 17447/54 (1954).
- [47] B. McCleary, N. Matheson, *Phytochemistry* 13 (1974) 1747-1757.
- [48] E. Azero, C. Andrade, *Polym. Test.* 21 (2002) 551-556.
- [49] M. Alves, A.Yu Antonov, L. Luciano, M. Gonçalves, *Int. J. Biol. Macromol.* 26 (1999) 181-185.
- [50] C. Andrade, E. Azero, L. Luciano, M. Goncalves, *Int. J. Biol. Macromol.* 26 (1999) 181-185.
- [51] C. Rafique, F. Smith, *J. Am. Chem. Soc.* 72 (1950) 4634-4637.
- [52] P. Andrews, L. Hough, J. Jones, *J. Am. Chem. Soc.* 74 (1952) 4029-4032.
- [53] V. Kapoor, *Phytochemistry* 11 (1972) 1129-1132.
- [54] S. Barker, M. Stacey, G. Zweifel, *Chem. Ind.* 11 (1957) 330-334.
- [55] B. McCleary, *Methods Enzymol.* 160 (1988) 523-527.
- [56] B. McCleary, in : J. John. Marshall, (eds), *mechanisms of saccharide polymerization and depolymerisation*, Academic Press N.Y. (1980) p 285-300.
- [57] A. Blakeney, P.Harris, R. Henry, B. Stone, *Carbohydr. Res.* 113 (1983) 291-299.
- [58] P. Daas, H. Schols, H. de Jongh, *Carbohydr. Res.* 329 (2000) 609-619.
- [59] P. Dakia, Thèse de Doctorat : Faculté universitaire des Sciences agronomiques de Gembloux (2009)
- [60] K. Parvathy, N. Susheelamma, R. Tharanathan, A. Gaonkar, *Carbohydr. Polym.* 62 (2005) 137-141.
- [61] J. Courtois, P. Le Dizet, *Carbohydr. Res.* 3 (1966) 141-151.
- [62] J. Courtois, P. Le Dizet, *Bull. Soc. Chim. Biol.* 50 (1968) 1695-1709.
- [63] I. Dea, B. McCleary, A. Clarck, *Carbohydr. Res.* 147 (1986) 275-294.
- [64] C. Baker, R. Whistler, *Carbohydr. Res.* 45 (1975) 237-243.
- [65] T. Painter, J. Gonzalez, P. Hemmer, *Carbohydr. Res.* 69 (1979) 217-226.
- [66] H. Grasdalen, T. Painter, *Carbohydr. Res.* 81 (1980) 59-66.
- [67] M. Gidley, A. McArthur, D. Underwood, *Food hydrocoll.* 5 (1991) 129-140.
- [68] M. Izydorczyk, C. Biliaderis, *Food hydrocoll.* 10 (1996) 295-300.
- [69] M. Vieira, A. Gill, *Carbohydr. Polym.* 60 (2005) 439-448.
- [70] T. Muschin, T. Yoshida, *Carbohydr. Polym.* 87 (2012) 1893-1898.
- [71] B. McCleary, A. Clark, I. Dea, D. Rees, *Carbohydr. Res.* 139 (1985) 237-260.
- [72] B. McCleary, *Methods in Carbohydr. Chem.*, vol. X (1991).

- [73] G. Richards, W. Whelan, *Carbohydr. Res.* 27 (1973), 185-191.
- [74] B. McCleary, N. Matheson, D. Small, *Phytochemistry* 15 (1976) 1111-1117.
- [75] A. Lazaridou, C. Biliaderis, M. Izydorczyk, *J. Sci. Food Agric.* 81 (2000) 68-75.
- [76] W. Sittikijyothin, D. Torres, M. Gonclaves, *Carbohydr. Polym.* 59 (2005) 339-350.
- [77] I. Dea, A. McKinnon, D. Rees, *J. Mol. Biol.* 68 (1972) 153-172.
- [78] C. Petkowicz, F. Reicher, K. Mazeau, *Carbohydr. Polym.* 37 (1998) 25-39.
- [79] P. Dakia, B. Wathelet, M. Paquot, *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 14 (2010) 213-223.
- [80] Y. Brummer, W. Cui, Q. Wang, *Food Hydrocoll.* 17 (2003) 229-236.
- [81] I. Dea, A. Clark, B. McCleary, *Food Hydrocoll.* 1 (1986) 129-140.
- [82] V. Kapoor, S. Mukherjee, *Phytochemistry* 10 (1971) 655-659.
- [83] P. Fernandes, *Carbohydr. Polym.* 16 (1991) 253-274.
- [84] G. Robinson, S. Ross-Murphy, E. Morris, *Carbohydr. Res.* 107 (1982) 17-32.
- [85] A. Clark, S. Ross-Murphy, *Adv. Polym. Sci.* 83 (1987) 57-192.
- [86] V. Kapoor, M. Milas, F. Taravel, M. Rinaudo, *Carbohydr. Polym.* 25 (1994) 79-84.
- [87] P. De Gennes, *Nature*, 282 (1979) 367-370.
- [88] F. Goycoolea, E. Morris, M. Gidley, *Carbohydr. Polym.* 27 (1995) 69-71.
- [89] I. Dea, E. Morris, D. Rees, J. Welsh, H. Barnes, J. Price, *Carbohydr. Res.* 57 (1977) 249-272.
- [90] P. Dakia, C. Blecker, C. Robert, B. Wathelet, M. Paquot, *Food hydrocoll.* 22 (2008) 807-818.
- [91] R. Tanaka, T. Hatakeyama, H. Hatakeyama, in: P. A. Williams, G. O. Phillips (Eds.), *Gums and stabilisers for the food industry* 9, Elyndwr University, UK, 1998
- [92] M. Iijima, T. Harakeyama, H. Hatakeyama, *Termochimica acta* 532 (2012) 83-87.
- [93] S. Monteiro, S. Rebelo, O. de Cruz e Silva, J. Lopez da Silva, *Food Hydrocoll.* 33 (2013) 349-360.
- [94] C. Schorsch, C. Garnier, J.-L. Doublier J.-L., *Carbohydr. Polym.* 28 (1995) 319-323.
- [95] B. McCleary, R. Amado, R. Waibel, H. Neukom, *Carbohydr. Res.* 92 (1981) 269-285.
- [96] M. Tako, A. Asato, S. Nakamura, *Agric. Biol. Chem.* 48 (1984), 2995-3000.

- [97] B. McCleary, Carbohydr. Res. 71 (1979) 205-230.
- [98] P. Cairns, M. Miles, V. Morris, G. Brownsey, Carbohydr. Res. 160 (1987) 411-423.
- [99] N. Cheetham, E. Mashimba, Carbohydr. Polym. 9 (1988) 195-212.
- [100] T. Bresolin, M. Milas, M. Rinaudo, F. Reicher, J. Ganter, Int. J. Biol. Macromol. 26 (1999) 225-231.
- [101] P. Daas, K. Grolle, T. van Vliet, H. Schols, H. De Jong, J. Agric. Food Chem 50 (2002) 4282-4289.
- [102] F. Renou, O. Petibon, C. Malhiac, M. Grisel, Food Hydrocoll. 32 (2013) 331-340.
- [103] C. Rochas, F. Taravel, T. Turquois, Int. J. Biol. Macromol. 12 (1990) 353-358.
- [104] D. Dunstan, Y. Chen, M.-L. Liao, R. Salvatore, D. Boger, M. Prica, Food hydrocoll. 15 (2001) 475-484.
- [105] C. Viebke, Carbohydr. Polym. 28 (1995) 101-105.
- [106] T. Turquois, C. Rochas, F. Taravel, Carbohydr. Polym. 17 (1992) 263-268.

4

L'hydrolyse en milieu high temperature water (HTW)

Note introductive

Les chapitres précédents concernaient la gomme caroube – en tant que polymère – et synthétisaient les informations disponibles sur l'extraction, la purification et le fractionnement de ces galactomannanes, ainsi que sur la relation entre la structure et les propriétés rhéologiques que de tels polymères développent en solution.

La partie expérimentale portant également sur l'hydroprocessing, ce procédé particulier et son impact potentiel sur les polysaccharides sont également décrits dans cette partie bibliographique. La thématique de l'hydroprocessing fait appel à des notions qui s'éloignent des chapitres précédents. Elle nécessite donc une introduction supplémentaire qui est à mettre en relation avec le Chapitre 7.

1.	Introduction.....	94
2.	Les propriétés physiques et chimiques de l'HTW.....	94
3.	L'effet de l'HTW sur la structure polymérique des hémicelluloses.....	98
4.	L'effet de l'HTW sur les monosaccharides	99
5.	Les paramètres influençant l'hydrolyse.....	103
6.	Bibliographie	106

1. Introduction

L'eau à haute température (HTW) – qui peut être définie comme de l'eau liquide au-dessus de 100 °C – et l'eau supercritique ($T > 374$ °C, $P > 218$ atm) sont de plus en plus utilisées comme milieu en chimie organique. Les réactions en conditions hydrothermales pourraient avoir contribué à l'origine de l'apparition la vie. A l'heure actuelle, la recherche explore les applications de l'HTW comme milieu réactionnel pour la synthèse chimique, la synthèse de matériaux, la destruction des déchets, le recyclage des plastiques, la liquéfaction du charbon, et le process de la biomasse [1], bien que des défis techniques restent nombreux. Plus particulièrement la recherche sur les conditions HTW est confrontée à des voies de réaction et des cinétiques inconnues ou non caractérisées, à des catalyseurs inadéquats qui ne supportent pas ces conditions, à la précipitation de matières inorganiques qui peut conduire à l'encrassement et aux problèmes de colmatage, ainsi qu'au besoin en matériel spécialisé résistant aux hautes températures, aux hautes pressions, et souvent aux environnements corrosifs [2].

2. Les propriétés physiques et chimiques de l'HTW

Les propriétés de l'HTW varient avec la température et la pression (ou densité) sur une large gamme de conditions proches du point critique et supercritiques [1].

Dans l'HTW, l'eau perd sa coordination tétraédrique en raison de la diminution de l'étendue du réseau de liaisons hydrogène (H). La liaison H est la source de la plupart des propriétés uniques de l'eau liquide. En général, la liaison H dans l'eau devient plus faible et moins persistante lorsque la température augmente et la densité diminue. Contrairement au réseau infini des liaisons hydrogène trouvé dans l'eau liquide à température ambiante, le réseau de liaisons hydrogène n'existe dans l'HTW que sous forme de petits groupes de molécules d'eau liées par liaison H, dont la distribution de taille est également inversement corrélée avec l'augmentation de température et la diminution de densité [1].

Les changements de liaisons hydrogènes sont également accompagnés de changement dans la constante diélectrique statique de l'eau. La constante diélectrique est un des paramètres importants impliqué dans l'effet de solvant de l'eau dans les réactions. Lors d'une réaction, l'état de transition peut être de polarité supérieure ou inférieure à l'état initial. Une constante diélectrique relative élevée réduit l'énergie d'activation d'une réaction pour un état de transition de plus haute polarité que l'état initial. Par conséquent, beaucoup de réactions ont un volume d'activation élevé. Il est donc possible de contrôler les taux de réaction en jouant sur la constante diélectrique relative, à l'aide de la température et de la pression [3]. La figure 1 indique que la constante diélectrique passe de 80 à 25 °C à moins de 2 à 450 °C [2]. Avec des constantes diélectriques si faibles, l'HTW se comporte plus comme un solvant organique polaire que comme de l'eau liquide à température ambiante [1].

Les changements structuraux de l'eau peuvent également affecter la dynamique des molécules d'eau. La diminution du réseau de liaisons hydrogène contribue également à l'augmentation de la diffusivité avec la température [1]. Avec un changement de densité de 1 à 0,1 g/cm³, la diffusivité augmente d'environ un ordre de grandeur.

La production d'ions est une autre propriété importante de l'eau qui a une influence sur les réactions et qui varie considérablement avec des changements de température et de densité. La production d'ions (K_w) ou autoprotonation de l'eau est définie comme le produit des concentrations d'ions acides et basiques de l'eau, $K_w = [H_3O^+][OH^-]$ (mol² kg⁻²) [2]. La production d'ions augmente légèrement avec la température pour arriver à 10⁻¹¹ dans la gamme entre 200 et 300 °C. Au-dessus de la température critique, le K_w diminue drastiquement avec l'augmentation de température (5 ordres de grandeur selon [2]) mais augmente avec la pression, pouvant même jouer le rôle d'un catalyseur acide ou basique dans de l'eau supercritique à haute pression. L'eau à haute température augmente dans ces conditions la concentration en ions H⁺ et OH⁻, générant un milieu idéal pour des réactions catalysées par des acides ou des bases [1]. Sous la température critique, les taux de réactions augmentent donc habituellement avec la température jusqu'au point critique puis diminuent ou augmentent de manière drastique, selon la chimie et les propriétés du milieu [3]. Les mécanismes ioniques semblent favorisés lorsque le $K_w > 10^{-14}$, tandis que les mécanismes radicalaires sont favorisés lorsque le $K_w \ll 10^{-14}$ [4].

Les changements de propriétés de l'HTW en font un milieu réactionnel intéressant en catalyse chimique. Selon les conditions l'HTW peut supporter des réactions ioniques polaires, non ioniques et sans radicaux. Les taux relatifs de ces différentes classes de réactions sont directement liés aux conditions du milieu [1].

L'utilisation d'eau à proximité du point critique, en tant que solvant, permet d'accélérer des réactions chimiques et d'améliorer leur efficacité. Cela est expliqué principalement par trois raisons : le coefficient de diffusion est important, la viscosité est faible et l'eau présente, dans ces conditions, la capacité de solubiliser complètement un grand nombre de substances [3]. La densité est également considérablement amoindrie lors de la montée en température. Ainsi, la structure de l'HTW approche celle d'un simple gaz en diminuant sa densité [1]. La figure 1 indique ainsi, qu'à 30 MPa, lorsque la température passe de 25 °C à 374 °C, des changements énormes de comportement de solvation de l'eau se produisent. L'eau, un solvant d'ordinaire polaire et soumis à de nombreuses liaisons hydrogène devient ainsi plus proche d'un solvant non-polaire tel que l'hexane [2]. Par conséquent, les petits composés organiques sont hautement solubles dans l'HTW et complètement miscibles dans l'eau supercritique [1]. En observant la figure 1, on observe déjà une modification des propriétés physiques du solvant au-delà de 100 °C.

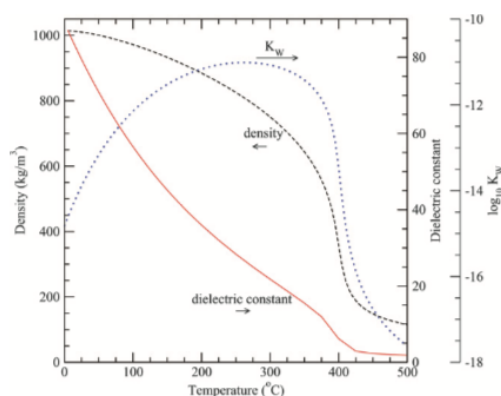


Figure 1. Densité, constante diélectrique statique et constante de dissociation ionique (K_w) de l'eau à 30 MPa, en fonction de la température. La constante diélectrique de l'eau chute de façon drastique lorsque la température augmente et se rapproche de celle d'un solvant non polaire dans des conditions supercritiques. D'après [2].

L'eau est également un partenaire de collision important dans de nombreuses réactions chimiques. Les réactions qui se déroulent dans la région critique sont fortement liées à la densité du solvant, car celle-ci a une influence sur les radicaux libres. Les études expérimentales et théoriques montrent ainsi que le taux de réactions radicalaires est dépendant de la pression. Le taux de réaction constant pour les réactions radicalaires augmente typiquement avec la pression jusqu'à une certaine valeur de plateau. Ces effets sont, en première approximation, indépendants de la nature du milieu de réaction. Ils sont une simple conséquence de l'augmentation de la fréquence des collisions [3].

L'eau est une molécule possédant un dipôle permanent. Elle est donc réactive dans de nombreux cas. L'eau supercritique est ainsi capable, lors de certaines étapes clés d'une oxydation totale, de prendre part à l'activation du complexe. En formant un tel complexe, l'énergie d'activation est abaissée, ce qui signifie que l'eau agit comme un catalyseur dans ce type de réactions. De tels complexes, générés par la présence d'eau en conditions critiques, sont apparus comme importants pour des hydrolyses de type SN_2 et des éliminations H_2 sur un alcool. Les réactions moléculaires sont importantes pour comprendre les mécanismes réactionnels aux alentours du point critique de l'eau, lorsque les réactions ioniques et radicalaires rentrent en compétition. En tant que solvant, l'eau peut plus facilement affecter les réactions chimiques dont le complexe activé possède une polarité qui est différente de celle des composés initiaux [3].

Ainsi, l'HTW n'est pas un milieu inerte mais un participant actif à la réaction. Dans ces conditions les molécules d'eau peuvent jouer le rôle de réactifs ou de catalyseurs. L'eau peut également contribuer aux changements d'énergie libre d'activation à travers des interactions soluté-solvant et la réorganisation du solvant. L'eau peut enfin influencer les réactions à travers le comportement de phase, les collisions soluté-solvant, les limitations de diffusion et les effets de cage [1]. L'HTW est un milieu réactionnel qui peut – à l'instar d'autres familles de molécules – favoriser l'hydrolyse et la transformation des saccharides, tant sous forme polymérisée, que sous forme de monomères.

3. L'effet de l'HTW sur la structure polymérique des hémicelluloses

L'utilisation de l'HTW sur la cellulose ou la lignocellulose, en vue de produire des biocarburants, est abondamment décrite dans la littérature. L'effet spécifique des conditions HTW sur la fraction hémicellulosique a, jusqu'à présent, fait l'objet de moins de travaux. L'hémicellulose est un hétéropolymère composé de monomères de sucres, incluant le xylose, le mannose, le glucose, le galactose et bien d'autres, qui peuvent également posséder des chaînes latérales. Ces fractions liées à la chaîne principale incluent l'acide acétique, les pentoses, les hexoses, les acides hexuroniques ainsi que les deoxyhexoses et sont responsables de la solubilité des hémicelluloses dans l'eau et les alcalis. Cette solubilisation a lieu uniquement si les hémicelluloses sont séparées du reste de la plante [5]. En raison du manque de répétitions de la liaison glycosidique de type β -(1-4) et de la nature aléatoire du polymère d'hémicellulose, aucune forme cristalline et résistante n'est observée comme c'est le cas pour la cellulose. L'hémicellulose est donc beaucoup plus facilement soumise à l'extraction hydrothermale et l'hydrolyse [2]. La compréhension cinétique des réactions reste toutefois mal comprise. La stabilité plus basse des hémicelluloses est principalement due au fait que leurs chaînes latérales et les groupes qui en dépendent, tels que les acides glucuroniques et acétiques, inhibent la formation de liaison hydrogène. Cette particularité confère au polymère une grande aptitude à être transporté par l'eau. Ainsi, l'hémicellulose est facilement dissoute dans de l'eau à la température de 180 °C et a fortiori, plus accessible aux attaques hydrolytiques. Toutefois, l'attaque des hémicelluloses en conditions hydrothermales requiert de plus hautes températures que lors de l'hydrolyse acide ou alcaline [5].

Les hémicelluloses ainsi solubilisées apparaissent principalement sous forme d'oligosaccharides ou de monosaccharides. L'hydrolyse en conditions hydrothermales présente, en réalité, des mécanismes similaires à ceux retrouvés lors de l'hydrolyse en présence d'acides dilués [6]. Les deux types d'hydrolyse sont ainsi catalysés par l'ion hydronium (H_3O^+). Lors de l'autohydrolyse, lorsque l'eau est le seul réactif ajouté au substrat, le catalyseur de l'hydrolyse est, dans un premier temps, l'ion hydronium provenant de l'auto-ionisation de l'eau. Cela mène à la dépolymérisation de l'hémicellulose par hydrolyse sélective des liaisons glycosidiques et des groupements acétyles.

Dans un second temps, les ions hydroniums issus des acides acétiques se comportent également comme des catalyseurs, améliorant ainsi la cinétique de la réaction. La contribution des ions hydroniums de l'acide acétique est plus importante que celle provenant de l'auto-ionisation de l'eau. Bien que présentant une certaine résistance à l'hydrolyse, des acides uroniques peuvent également être libérés dans le milieu, en même temps que les acides acétiques. Ils peuvent donc contribuer à la formation des ions hydroniums, même si leur rôle exact n'est toujours pas complètement compris.

En réalité, les acides résultant de l'hydrolyse des groupements acétyles et uroniques catalysent aussi bien l'hydrolyse des liens entre hémicellulose et lignine que les liaisons entre les hydrates de carbone. Les traitements hydrothermaux vont donc convertir l'hémicellulose en saccharides solubles, avec de hauts rendements et peu de formation de sous-produits [6].

[7] ont trouvé qu'ils pouvaient extraire un pourcentage de 95% de l'hémicellulose, sous forme de sucres monomériques, en seulement quelques minutes à 34,5 MPa et de 200 à 230 °C.

Au niveau de la cinétique d'hydrolyse, la décomposition d'une chaîne d'hémicellulose semble se produire prioritairement via l'apparition d'oligomères. Ceux-ci disparaîtraient ensuite au cours du temps de la réaction en produisant des monomères. Il a ainsi été démontré que la plupart du xylose, relâché en solution et issu d'une fraction hémicellulosique constituée de xylan, l'était sous la forme d'oligomères, lesquels étaient ensuite décomposés en monomères de xylose [8]. Des temps d'action plus longs pourraient augmenter la récupération de xylose monomérique aux dépens d'une diminution du rendement total car le xylose pourrait être converti par la suite en produits de dégradations.

4. L'effet de l'HTW sur les monosaccharides

Lorsque le glucose et le fructose se dissolvent dans l'eau, il existe pour chacun 3 formes possibles : en chaîne ouverte, en pyranose et en furanose. Le glucose peut également s'isomériser de manière réversible en fructose. Ainsi, lorsque le glucose et le fructose sont tous deux présents en solution aqueuse, 6 formes différentes de

monosaccharide sont présentes [2]. Ces deux sucres suivent les mêmes voies de réactions lorsqu'ils sont soumis à des conditions hydrothermales (figure2).

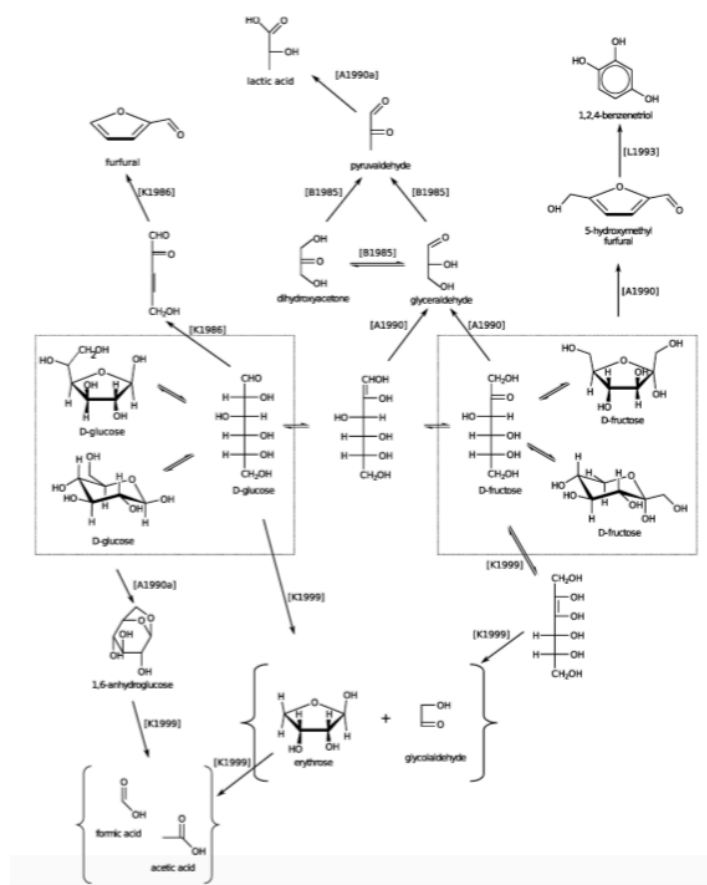


Figure 2. Produits de dégradation des hexoses en conditions HTW. D'après [2].

Toutefois, le taux d'inter-isomérisation est plus lent que le taux de dégradation du glucose ou du fructose [9]. Le fructose semble également plus réactif que le glucose. D'une part, le taux d'isomérisation du fructose en glucose est beaucoup moins important que l'inverse [10] et d'autre part, malgré l'isomérisation, le fructose réagit beaucoup plus vite que le glucose, du moins en présence d'acide phosphorique. Ainsi après deux minutes à 340 °C, le fructose est détruit à 98% tandis que le glucose seulement à 52% [11]. Ces auteurs ont observé qu'à température ambiante,

la forme acyclique du glucose (c'est-à-dire la plus réactive) se trouve de manière moins abondante que celle du fructose. Ils en ont déduit que le même principe pourrait expliquer la réactivité plus basse du glucose en conditions hydrothermales.

L'hydrolyse du glucose et du fructose a été étudiée depuis plus d'un siècle, et toutes les études confirment leurs dégradations rapides en conditions hydrothermales (figure 3) [10, 12, 13, 14].

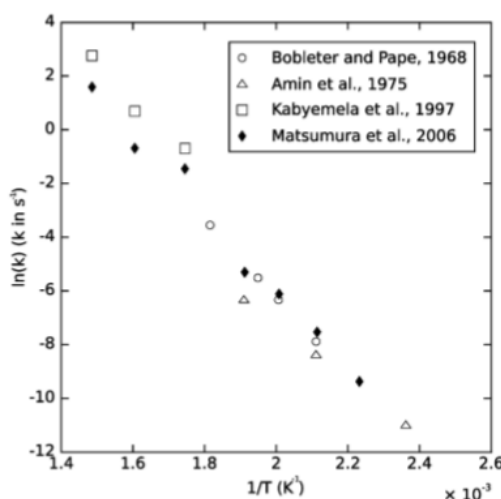


Figure 3. Tracé d'Arrhenius (du premier ordre) des données de dégradation du glucose. D'après [2].

Comme le taux d'isomérisation entre le glucose et le fructose est lent par rapport à leur taux de dégradation, différents produits majeurs sont observés à partir de glucose et de fructose.

Alors que les différentes conditions de réactions et techniques analytiques employées induisent des différences dans les produits relatés dans la littérature, la plupart des publications s'accordent toutefois sur le fait que le glucose se dégrade le plus souvent en produits de fragmentation (glycolaldéhyde, pyruvaldéhyde, glyceraldéhyde, etc.), tandis que le glucose aura tendance à former le produit de déshydratation appelé 5-hydroxymethylfurfural (5-HMF) [9, 15, 16, 17].

[18] reportent que le composé aromatique 1,2,4 benzenetriol peut être formé dans des rendements significatifs à partir de fructose. Ils ont également déterminé que ce composé peut être formé dans des rendements jusqu'à 46% à partir de 5-HMF. Cela est assez intéressant car dans le cas des prétraitements lignocellulosiques, il est souvent admis que ce composé provient de la fraction ligneuse. Ces auteurs montrent ainsi que des composés aromatiques peuvent aussi être formés à partir de sucres cellulosiques. [19] avaient déjà émis cette hypothèse en démontrant la formation de composés aromatiques à partir de cellulose pure mise en œuvre dans des réactions hydrothermales (250 à 400 °C).

Le glucose peut donc être converti en furfural et parallèlement en acides et aldéhydes. Par après, la conversion des furfurals mène à la formation d'acides, d'aldéhydes et de phénol. Les acides et aldéhydes sont les précurseurs de composés gazeux. Le furfural se forme par déshydratation, et la déshydratation ultérieure du furfural donne du phénol. A contrario, les acides et aldéhydes sont produits par des réactions de rupture de liaisons [20].

L'effet de l'HTW sur le xylose est assez similaire à ce qui est observé sur le fructose et le glucose. Le xylose peut exister dans l'eau sous forme de pyranose, de furanose ou de chaîne ouverte. [21] ont proposé un mécanisme de conversion du xylose en furfural. Le furfural serait formé par la forme pyranosique du xylose ; la forme furanosique serait trop stable, dans leurs conditions opératoires, pour les nouvelles transformations chimiques. La forme ouverte aura tendance à former du glyceraldéhyde, du pyruvaldéhyde, de l'acide lactique, du glycolaldéhyde, de l'acide formique et de l'acétol, qui résultent de la fragmentation des sous-produits lors la production de furfural. La stabilité de la forme furanose couplée au faible taux d'isomérisation entre les trois formes, explique la présence d'une faible et persistante concentration en xylose dans les produits, même après des temps de traitement relativement long à 250 °C. Ce mécanisme a récemment été confirmé par des simulations moléculaires dynamiques *ab initio* [22].

[21] ont montré que le furfural est formé directement à partir de xylose. [23] ont démontré que ce furfural pouvait également se dégrader sous des conditions hydrothermales, mais à un taux inférieur à sa propre production à partir de xylose. Une étude cinétique de cette réaction a montré que la contribution de la condensation rétro-aldol et de la déshydratation au taux global de décomposition est en accord avec ce que l'on observe dans le cas du glucose en conditions hydrothermales [24].

Ces auteurs ont également montré, que dans des gammes de températures plus élevées (360-420 °C), la quantité de produits de dégradations formés (glycolaldéhyde, glyceraldéhyde, pyruvaldéhyde et dihydroxyacétone) est plus importante que celle de furfural, pour des temps de réactions de 0,1-0,25 secondes et sous des pressions de 25-40 MPa.

Le xylose est aussi capable de donner naissance à des composés aromatiques lors de dégradations hydrothermales, dans des conditions acides à 300 °C [19].

Au niveau industriel, la plupart de la production de furfural (2-furaldéhyde) est réalisée à partir de xylose issus d'hémicellulose [2].

5. Les paramètres influençant l'hydrolyse

La température peut également avoir un impact considérable sur les voies de réactions [14, 25, 26]. Ainsi, à haute température et basse densité aqueuse, les réactions radicalaires se produisent fréquemment tandis que les réactions ioniques se produisent plutôt à basse température et haute densité d'eau [3].

En plus des conditions de réaction (température, pression, densité de l'eau,...), les « additifs » (acides ou bases) peuvent également influencer les réactions impliquant le glucose, spécialement à de plus basses températures.

De nombreuses réactions sont donc sensibles au pH. Il a été reporté que la condensation retro-aldol et l'isomérisation étaient favorisées en conditions basiques tandis que la catalyse acide avait tendance à augmenter les réactions de déshydratation [27]. De nombreux auteurs ont donc étudié l'ajout d'acides et de bases homogènes (tels que respectivement l'acide sulfurique et l'hydroxyde de sodium) au milieu réactionnel.

[28] ont étudié les cinétiques de décomposition du glucose dans des solutions d'acides dilués, entre 180 et 230 °C. Ils ont trouvé que des conditions de températures de 200 °C et des pH assez bas augmentaient la destruction du glucose (conversion de l'ordre de 68% après 30 minutes, à pH de 1,5).

Le même type d'expérience a été mené à partir de fructose [9]. L'addition de 2 mM d' H_2SO_4 a eu pour conséquence de modifier significativement les modes de dégradation du fructose, causant ainsi une augmentation de rendement de production de 5-HMF et de furfural, au dépens de la production de pyruvaldéhyde et d'acide lactique. Aucune modification n'a été observée au niveau de l'isomérisation du fructose en glucose.

[11] ont travaillé dans le but d'optimiser les rendements de 5-HMF à partir de fructose. Ils ont trouvé que l'acide phosphorique était le meilleur acide de catalyse testé, donnant un rendement de 65% de 5-HMF à 240 °C, après 120 secondes et en utilisant une solution 0,05 M en fructose à un pH de 2, ajusté à l'acide phosphorique.

Comme les « additifs » homogènes cités précédemment ont des impacts sur l'environnement, certains chercheurs ont étudié l'influence d'« additifs » acides et basiques hétérogènes, tels que les oxydes métalliques, sur les réactions du glucose.

Ils ont trouvé que l'addition de ZrO_2 peut également promouvoir l'isomérisation du glucose et du fructose. Le ZrO_2 peut donc être considéré comme un catalyseur de base du glucose. Le TiO_2 peut également augmenter l'isomérisation et la déshydratation en HMF, indiquant la présence de sites acides et basiques à sa surface [29, 30].

D'autres sucres dérivés des hémicelluloses, tels que le mannose, le galactose et l'arabinose ont été étudiés en conditions hydrothermales (340 °C 27,5 MPa) par [15]. Aucune différence qualitative n'a été trouvée entre les produits formés par ces sucres à 6 carbones et ceux obtenus à partir de xylose, même si les quantités obtenues de ces divers composés et leurs taux de formation dépendent fortement de la nature des sucres d'origine. Les produits de décomposition de l'arabinose sont principalement le glycolaldéhyde et le 2-furaldéhyde qui sont aussi ceux obtenus lors de la décomposition du xylose [27]. Il est donc possible de conclure que les mécanismes de décomposition des sucres issus d'hémicellulose (« C5 » ou « C6 ») sont similaires en conditions hydrothermales.

[31] ont étudié les cinétiques de réaction de dégradation de l'hémicellulose en sucres ainsi que la dégradation subséquente de ces derniers en furfurals et autres produits de dégradation. D'après eux, la plupart des études rapportent des taux d'extraction d'hémicellulose et de récupération en sucres simples ou en oligomères, situés entre 65 et 82%.

Les modèles courants d'hydrolyse de l'hémicellulose sont la plupart du temps construits à partir des résultats de l'hydrolyse de la cellulose [32].

Ainsi, les produits issus d'une hydrolyse hydrothermale sont une mixture d'oligosaccharides, de monosaccharides, d'acide acétique, et de dérivés du furane (furfural et hydroxyméthylfurfural), qui pourront par la suite subir des réactions de décomposition menant à la formation d'acide formique et levulinique [6].

6. Bibliographie

- [1] AKIYA N. and SAVAGE P. [2002]. Roles of water for chemical reactions in high-temperature water. *Chemical Reviews* **102**, 2725-2750.
- [2] PETERSON A., VOGEL F., LACHANCE R., FRÖLING M., ANTAL M., TESTER J. [2008]. Thermochemical biofuel production in hydrothermal media : A review of sub- and supercritical water technologies. *Energy & Environmental Science* **1**, 32-65.
- [3] WATANABE M., SATO T., INOMATA H., SMITH R., ARAI K., KRUSE A., DINJUS E. [2004]. Chemical reaction of C₁ compounds in near-critical and supercritical water. *Chem. Rev.* **104**, 5803-5821.
- [4] ANTAL M., BRITTAIN A., DEALMEIDA C., RAMAYYA S., ROY J. [1987]. *Heterolysis and homolysis in supercritical water*, in supercritical fluids : Chemical and Engineering principles and applications (ACS Symposium Series 329), 77-86.
- [5] BOBLETER O. [1994]. Hydrothermal degradation of polymers derived from plants. *Prog. Polym. Sci.* **19**, 797-841.
- [6] CARVALHEIRO F., DUARTE L., GIRIO F. [2008]. Hemicellulose bio-refineries: a review on biomass pretreatments. *Journal of Scientific & Industrial Research* **67**, 849-864.
- [7] MOK W., ANTAL M., VARHEGYI G. [1992]. Productive and parasitic pathways in dilute acid catalysed hydrolysis of cellulose. *J. Ind. Eng. Chem. Res.* **31**, 94-100.
- [8] JACOBSEN S. and WYMAN C. [2002]. Xylose monomer and oligomer yields for uncatalyzed hydrolysis of sugarcane bagasse hemicellulose at varying solids concentration. *J. Ind. Eng. Chem. Res.* **41**(6), 1454-1461.
- [9] ANTAL M., MOK W., RICHARDS G. [1990]. Mechanism of formation of 5-(hydroxymethyl)-2-furaldehyde from D-fructose and sucrose. *Carbohydrate Research* **199**(1), 91-109.
- [10] KABYEMELA B., ADSCHIRI T., MALALUAN R., ARAI K. [1997]. Kinetics of glucose epimerization and decomposition in subcritical and supercritical water. *J. Ind. Eng. Chem. Res.* **36**(5), 1552-1558.
- [11] SALAK ASGHARI F. AND YOSHIDA H. [2006]. Acid-catalyzed production of 5-hydroxymethyl furfural from D-fructose in subcritical water. *J. Ind. Eng. Chem. Res.* **45**(7), 2163-2173.

- [12] MATSUMURA Y., YANACHI S., YOSHIDA T. [2006]. Glucose decomposition kinetics in water at 25 MPa in the temperature range of 448-673 K. *J. Ind. Eng. Chem. Res.* **45**(6), 1875-1879.
- [13] BOBLETER O. and PAPE G. [1968]. Der hydrothermale Abbau von Glucose. *Monatsh. Chem.* **99**, 1560-1567.
- [14] AMIN S., REID R., MODELL M. [1975]. *Reforming and decomposition of glucose in an aqueous phase*, in Intersociety Conference on Environmental Systems, San Fransisco, ASME paper 75-ENAS-21.
- [15] SROKOL Z., BOUCHE A., VAN ESTRICK A., STRIK R., MASCHMEYER T., PETERS J. [2004]. Hydrothermal upgrading of biomass to biofuel: studies on some monosaccharide model compounds. *Carbohydrate Research* **339**(10), 1717-1726.
- [16] BONN G. and BOBLETER O. [1983]. Determination of the hydrothermal degradation products of D-(-U-¹⁴C) glucose and D-(-U-¹⁴C) fructose by TLC. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **79**(2), 171-177.
- [17] CHHEDA J., HUBER G., DUMESIC J. [2007]. Liquid-Phase Catalytic Processing of Biomass-Derived Oxygenated hydrocarbons to Fuels and Chemicals. *Angew. Chem. Int.* **46**, 7164-7183.
- [18] LUIJKX G., VAN RANTWIJK F., VAN BEKKUM H. [1993]. Hydrothermal formation of 1,2,4-benzotriol from 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde and D-fructose. *Carbohydrate Research* **242**, 131-139.
- [19] NELSON D., HALLEN R., THEANDER O. [1988]. *Formation of aromatic compounds from carbohydrates: Reaction of xylose, glucose and glucuronic acid in acidic solution at 300 °C*, in *pyrolysis oils from biomass (ACS Symposium Series 376)*, chapter 11, ed. E. Soltes and T Milne, American Chemical Society, pp. 113-118.
- [20] SINAG A., KRUSE A., RATHERT J. [2004]. Influence of the heating rate and the type of catalyst on the formation of key intermediates and on the generation of gases during hydrolysis of glucose in supercritical water in a batch reactor. *J. Ind. Eng. Chem. Res.* **43**(2), 502-508.
- [21] ANTAL M., LEESOMBOON T., MOK W., RICHARDS G. [1991]. Mechanism of formation of 2-furaldehyde from D-xylose. *Carbohydrate Research* **217**, 71-85.
- [22] QIAN X., NIMLOS M., JOHNSON D., HIMMEL M. [2005]. Acidic sugar degradation pathway. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **124**(1), 989-997.
- [23] JING Q. and LU X. [2007]. Kinetics of non-catalysed decomposition of D-xylose in high temperature liquid water. *Chin. J. Chem. Eng.* **15**(5), 666-669.
- [24] SASAKI M., HAYAKAWA T., ARAI K., ADSCHIRI T. [2003]. *Mesurement of the rate of retro-aldol condensation of D-xylose in subcritical and supercritical water*,

in *Hydrothermal Reactions and Techniques: The Proceedings of the Seventh International Symposium on Hydrothermal Reactions*, ed. S. Feng, J. Chen and Z. Shi, World Scientific Publishing Co., Singapore, pp. 169-176.

[25] MODELL M. [1985]. *Gasification and liquefaction of forest products in supercritical water*, in *Fundamentals of Thermochemical Biomass Conversion*, ed R. P. Overend, T. A. Milne and L. K. Mudge, Elsevier Applied Science, New-York, pp. 95-119.

[26] WOERNER G. [1976] *Thermal decomposition and reforming of glucose and wood at the critical conditions of water*. Master's thesis, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, Massachusetts.

[27] YU Y., LOU X., WU W. [2008]. Some recent advances in hydrolysis of biomass in hot-compressed water and its comparisons with other hydrolysis methods. *Energy Fuels* **22**(1), 46-60.

[28] XIANG Q., LEE Y., TORGET R. [2004]. Kinetics of glucose decomposition during dilute-acid hydrolysis of lignocellulosic biomass. *Appl Biochem. Biotechnol.* **113-116**, 1127-1138.

[29] WATANABE M., INOMATA H., ARAI K. [2002]. Catalytic hydrogen generation from biomass (glucose and cellulose) with ZrO₂ in supercritical water. *Biomass and bioenergy* **22**, 405-410.

[30] WATANABE M., AIZAWA Y., IIDA T., NISHIMURA R., INOMATA H. [2005]. Catalytic glucose and fructose conversion with TiO₂ and ZrO₂ in water at 473 K: Relationship between reactivity and acid-base property determined by TPD measurement. *Applied catalysis A : General* **295**, 150-156.

[31] GAROTE G., DOMNGEZ H., PARAJ J. [1999]. Hydrothermal processing of lignocellulosic materials. *Holz Roh- Werkst* **57**(3), 191-202.

[32] LAVARACK B., GRIFFIN G., RODMAN D. [2002]. The acid hydrolysis of sugarcane bagasse hemicellulose to produce xylose, arabinose, glucose and other products. *Biomass & Bioenergy* **23**, 367-380.

RÉSULTATS

5

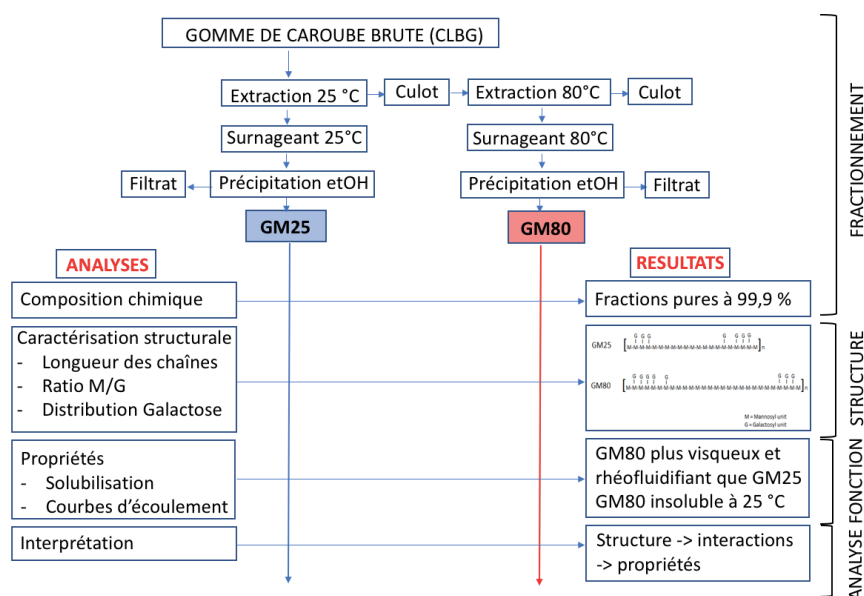
Impact of purification and fractionation process on the chemical structure and physical properties of locust bean gum.

Gillet, S., Blecker, C., Aguedo, M., Laurent, P., Paquot, M., & Richel, A. (2014). Impact of purification and fractionation process on the chemical structure and physical properties of locust bean gum. *Carbohydrate Polymers* 108.

Note introductive

Les chapitres 2 et 3 ont permis de dresser l'état des lieux actualisé de la relation purification – structure – propriétés des galactomannanes et plus spécifiquement de ceux de caroube. Ils ont également permis de mettre en évidence certaines zones d'ombres sur le sujet, et notamment le fait que la distribution fine des galactosyls n'est généralement pas prise en compte (et surtout mesurée réellement) dans la plupart des études sur le sujet. D'autre part, le travail de synthèse a également permis d'apprendre qu'il était possible, par fractionnement soustractif, de générer des fractions aux propriétés différentes, probablement en raison de structures moyennes différentes.

Sur cette base, ce chapitre vise à établir le lien entre la purification, le fractionnement et la relation structure-propriété des galactomannanes. L'élucidation de la structure chimique fine (incluant la distribution des substituants galactosyls) de deux fractions issues de la gomme de caroube brute est corrélée avec la caractérisation de leurs propriétés physiques appliquées spécifiquement à l'étude des cinétiques de solubilisation et la formation de réseaux dans les dispersions visqueuses et les gels associés. Le protocole mis en place et les résultats qui en découlent sont représentés au schéma suivant.



1.	Abstract	113
2.	Introduction	113
3.	Materials and Methods	116
3.1.	Materials.....	116
3.2.	Purification and temperature fractionation	116
3.3.	Analyse of composition.....	117
3.3.1.	Moisture content.....	117
3.3.2.	Protein analysis.....	117
3.3.3.	Fat and ash analyses.....	118
3.3.4.	Crude fibre	118
3.3.5.	Total hemicellulose analysis	118
3.4.	Structural characterisation of GM25 and GM80.....	118
3.4.1.	Measurement of mannose/galactose ratio	118
3.4.2.	Measurement of α -D-galactopyranosyl distribution along the D-mannan backbone.....	119
3.4.3.	Measurement of molecular weight	120
3.5.	Physical properties in solution/dispersion	120
3.5.1.	Solubilization kinetics.....	120
3.5.2.	Viscosity and viscoelasticity	121
3.5.3.	Gel formation in association with other polysaccharides.....	121
4.	Results and discussion.....	122
4.1.	Chemical characterization	122
4.2.	Structural characterization.....	123
4.3.	Physical Properties.....	130
4.3.1.	Solubilization kinetics.....	130
4.3.2.	Viscosity and viscoelasticity	132
4.3.3.	Formation of associative gels.....	134
5.	Conclusions and perspectives	135
6.	References	137

1. Abstract

This study aims therefore to completely establish links between the purification/fractionation process of carob galactomannans and their “structure-property” relationship. Elucidations of the fine chemical structure (including distribution pattern of lateral substituents) of different samples of galactomannans, obtained by temperature subtractive fractionation, are correlated with the characterization of their physical behavior, through the study of solubilization kinetics or network formation in viscous dispersions and associated gels.

2. Introduction

Locust bean gum (LBG) is an additive (E410) used mainly in the food industry for its rheological, texturing and gelling properties. The combination of LBG with other polysaccharides – such as xanthan and carrageenan unable to jellify alone – has been also used in industry for a long time. Specific force gels may be formed by this economically interesting technique to give unique properties for specific applications [1]. Locust bean gum is made from the endosperm of the seeds of the carob tree (*Ceratonia siliqua* L.). The endosperm is composed of reserve polysaccharides (hemicelluloses) called galactomannans.

Galactomannans consist of a β -(1 \rightarrow 4) D-mannopyranosyl backbone substituted to varying degrees in α -(1 \rightarrow 6) with single D-galactopyranosyl residues [2]. This basic structure is the same for all galactomannans. However, three elements allow distinction between these polysaccharides: the degree of substitution of galactose, the molecular sizes, and the distribution pattern of galactosyl substituents along the main chain of mannans. Different kinds of distributions, existing in nature, have been proposed in the literature: (a) the regular arrangement, (b) the random and (c) uniform layout of blocks (Fig. 1).

However, intermediate structures between these three "types" may also exist [3]. The few methods to evaluate distribution patterns of lateral galactosyls on galactomannans are quite conventional techniques: determination of degree of blockiness, [^{13}C]-NMR (Nuclear Magnetic Resonance) analysis or computer modelling after enzymatic hydrolysis [5-11]. These studies show that the galactomannans block structure is not quite accurate [1]. The fine structure of the galactomannans locust bean is most likely composed of "smooth" zones (low substituted) and "hairy" zones (much denser in side galactosyls, without being systematically adjacent).

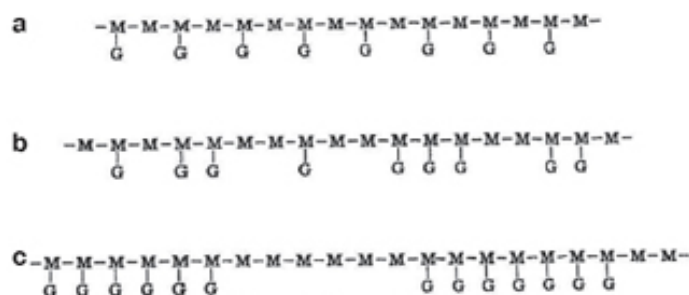


Figure 1. Different theoretical kinds of galactosyl distributions proposed in the literature : (a) the regular arrangement, (b) the random arrangement, and (c) uniform layout of blocks (According to [3], with the permission from Elsevier).

The production process of locust bean gum consists in obtaining a crude gum by grinding endosperms. Then purification treatments can take place in order to increase the proportion of galactomannans and eliminate odors, impurities and endogenous enzymes [12]. Clarifying is then the most common process. It consists of a dissolution of the gum in water, soda or acetic acid, followed by a filtration [13] or a centrifugation step [3] to remove insoluble materials. Galactomannans are then precipitated using solvents such as ethanol [14], isopropanol [3, 15, 16] or methanol [17]. Precipitation of galactomannans can also be obtained by the formation of cupric complexes [14, 18], barium complexes [19] or by precipitation in borate buffer [20].

The purification step has a major influence on the composition and properties of locust bean gums. During clarification, the dissolution temperature is a crucial parameter which influences the average chemical structure of the resulting gum, that is also correlated to the physical properties observed in aqueous solution or dispersion. Thus, a locust bean gum purified at “cold” temperature (about 20 °C) exhibits properties significantly different from those of “hot” extracts (above 40 °C) [21]. The solubility properties are sometimes used for successively re-extracting the same crude LBG to obtain fractions of structural narrower distributions. This subtractive fractionation provides specific properties of gums [1]. Temperature is not the only factor impacting on the properties of the clarified/fractionated locust bean gum. The type and amount of solvent used during precipitation play also an important role [22].

Several theories correlate purification process with chemical structure [12, 16, 23-25] or with physical behavior of galactomannans [7, 12, 16, 22, 23, 26], but the process-structure-properties relationship has not been thoroughly investigated. Some authors have established the relationship between chemical structures and properties in solution/dispersion [7, 8, 12, 16, 23, 27-32]. Unfortunately, the structural characteristics mostly determined are molecular weight and degree of substitution of galactose. The distribution pattern of lateral substituents is ignored in most cases, although it seems likely to impact profoundly the physical characteristics of a galactomannan solution and dispersion (solubility, viscosity, gel formation, etc.). On the other hand, most studies are based on a commonly accepted chemical structure for locust bean gum (blocks distribution or “smooth” and “hairy” regions) to interpret physical measurements carried out, without checking that the studied samples really have the structure assumed [3, 33-37].

This study aims therefore to completely establish links between the purification/fractionation process of carob galactomannans and their “structure-property” relationship. Elucidations of the fine chemical structure (including distribution pattern of lateral substituents) of different samples of galactomannans, obtained by temperature subtractive fractionation, are correlated with the characterization of their physical behavior, through the study of solubilization kinetics or network formation in viscous dispersions and associated gels.

3. Materials and Methods

3.1. *Materials*

Locust bean gum (LBG) was obtained from PFW Ltd. (Greenford, UK) as the product sold under the trade mark HERCOGUM N1. α -galactosidase enzyme (EC 3.2.1.22) has been provided by Megazyme International (Bray, Irlande). All others chemicals were purchased from commercial suppliers and used as received.

3.2. *Purification and temperature fractionation*

A 1% massic dispersion of CLBG was prepared by mixing 10 g of gum in 1 L of distilled water with an Ultra-Turrax homogeniser (IKA, Staufen, Germany) at 25 °C. The dispersion was then mixed by a 400 rpm magnetic stirrer for 3 hours at 25 °C before being centrifuged (8000 g, 25 °C, 30 min) to remove insoluble materials. The supernatant was precipitated by pouring into a two-volume-excess of absolute ethanol. The precipitated material was then filtered, washed twice with ethanol and acetone, resolubilized in 20 °C water by mixing, freeze-dried and milled until a fine grinding was obtained (< 1mm) (Fig. 2). This fraction is called GM25. The pellet obtained after centrifugation (about 6 g of dry materials) was resuspended in 1 L of distilled water at 80 °C and underwent the same procedure of impoverishment at 80 °C to give the GM80 fraction. This subtractive fractionation was realised in triplicate.

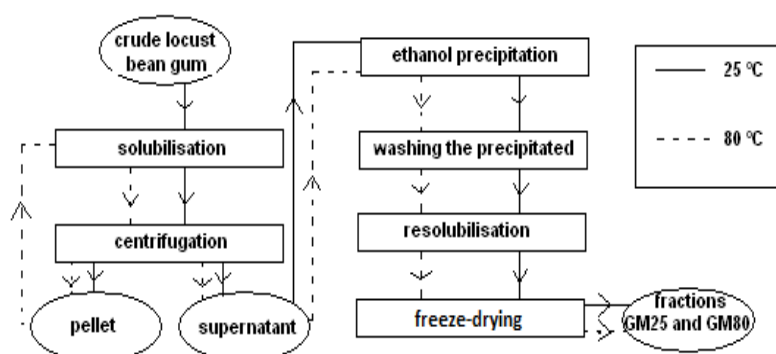


Figure 2. Illustration of the purification and temperature fractionation process.

3.3. *Analyse of composition*

3.3.1. Moisture content

1 g of all the fractions was held in an oven at 105 °C and weighted regularly until readings stabilised. All values were then expressed on a dry matter basis.

3.3.2. Protein analysis

Protein contents in the CLBG and fractions GM25 and GM80 were estimated by the Kjeldahl procedure, after mineralisation (with a 1000 KJELTABS MQ tablet and a Digestion System 20, 1015 Digester, Tecator AB) and distillation (by a Kjeltec Auto 1030 Analyser, Tecator AB) with a conversion factor of 5.87 according to [38].

3.3.3. Fat and ash analyses

A mixture of chloroform and methanol (respectively in proportion v/v 2:1) at 65 °C was used according to the Soxhlet procedure to extract the fat in approximately 5 g of sample, for 5 h. For ash analysis, 3 g of each sample were burned to ash for 12 h in a muffle furnace at 600 °C.

3.3.4. Crude fibre

Crude fibre (cellulose and lignin) was determined by the acid-detergent fibre method (ADF) [39] in a Fibertec system (Brussels, Belgium) using cetyltrimethylammonium bromide in 1 M sulphuric acid previously standardised as the acid detergent solution. 1 g of each sample was analyzed twice.

3.3.5. Total hemicellulose analysis

The amount of total hemicellulose was estimated as the remainders of the samples after the other substances (protein, fat, ash, crude fibre and moisture) were accounted for. This fraction was considered as totally consisting of galactomannans [12].

3.4. Structural characterisation of GM25 and GM80

3.4.1. Measurement of mannose/galactose ratio

Mannose/galactose (M/G) ratios were calculated using an adaptation of the method described by Blakeney [40]. 50 mg of each sample were hydrolysed by 3 mL of 1 M sulphuric acid, in a sealed Sovirel tube at 105 °C for 3 h. The resulting aldoses were reduced in alditol acetates. 2-deoxyglucose was used as internal standard. Gas chromatography analyses were performed on a HP Agilent 6890 series chromatograph (Agilent Technologies, Diegem, Belgium) with a flame ionization detector equipped with HP-1 capillary column (30 m x 32 mm, 0.25 film thickness,) coated with methylsiloxane. 2 µL-samples were injected in splitless mode. Initial temperature of 120 °C in the system was increased to 220 °C at a rate 4 °C/min. Helium was used as the carrier gas with a flow rate of 1.6 mL/min. The temperature of the injector and the detector were 290 °C and 320 °C respectively.

3.4.2. Measurement of α -D-galactopyranosyl distribution along the D-mannan backbone.

Two different and complementary techniques were used in order to estimate galactose distribution along the mannan main chain. The first one, a method proposed by [4], was an alkaline degradation that gives information about the degree of blockiness of each sample. In this method, gas chromatography analyses were performed on a HP Agilent 6890 series chromatograph coupled to a HP 5973 mass spectrometer selective detector, equipped with HP-1 capillary column (30 m x 32 mm, 0.25 film thickness) coated with methylsiloxane (all devices from Agilent Technologies, Diegem, Belgium). 1 μ L-samples were injected in splitless mode. Initial temperature of 90 °C in the system was increased to 220 °C at a rate 4 °C/min. Helium was used as the carrier gas with a flow rate of 1.0 mL/min. The temperature of the injector was 290 °C. Mass detector was conducted with electronic impact (EI) mode at 70 eV, source and quadrupole temperatures were set at 230 °C and 150 °C respectively. Identification of 1,5-di-*O*-acetyl-2,3,4,6-tetra-*O*-methyl-D-mannitol and 1,4,5-tri-*O*-acetyl-2,3,6-tri-*O*-methyl-D-mannitol, with levels of certainty of 91% and 83% respectively, was performed using a NBS mass spectral database.

The second method used was based on the [^{13}C]-NMR spectroscopy works [6] together with [7, 9]. The [^{13}C]-NMR spectroscopy was performed on a Varian Unity 600 MHz instrument spectrometer (Oxford, UK) operated at 90 °C to diminish viscosity and, thereby, line-width. The fractions (1.5 % w/v) were dissolved in H_2O containing 10 % D_2O . 50 000 pulses were collected; pulse acquisition time was 0.865 s and r.f. pulse angle was 90 °C. Chemical shifts were expressed relatively to external DSS.

The crude locust bean gum was hydrolyzed (HCLBG) by α -galactosidase to obtain a comparative control in the analysis. HCLBG was obtained from a 5 g/L CLBG dispersion in acetate buffer. 500 ml of enzyme (65 U/mg) were added to 0.5 L of dispersion and stirred for 20 h at 40 °C and a pH of 4.68. HCLBG was recovered by precipitation in 2 volumes of ethanol, dried at room temperature and milled until a fine grinding was obtained (< 1 mm).

3.4.3. Measurement of molecular weight

The scattering light from a polydisperse macromolecular solution can be used to measure the molecular weight (Mw) distribution. This is usually obtained by the Zimm method, i.e. the scattering intensity is measured at different angles and concentrations, followed by an extrapolation to zero angle and zero concentration. This procedure gives the absolute value of the weight average Mw [41]. Measurements were determined in triplicate using a high performance size exclusion chromatography (HPSEC) HP 1200 series apparatus (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) equipped with a TSK-gel GMPWxl column (30 cm x 7.5 mm; particle size 13 μ m) (Tosoh Corporation, Tokyo, Japan), coupled to a BI-DNDC refractometer and a BI-MwA multi-angle laser light scattering (MALLS) (both from Brookhaven Instruments Co., Holtsville, NY, USA).

The GM25 and GM80 fractions samples were solubilized (0.5 mg/mL) in deionized water and heated at 90 °C overnight under mechanical stirring. Similarly the samples were also solubilized in phosphate buffer (50 mM KH_2PO_4 : NaOH 1:3, pH 8), in order to estimate molecular aggregation [31]. Deionized water and phosphate buffer were respectively used as eluent, with a flow rate of 1 mL/min at 40 °C. The samples were filtered through the 0.45 μ m internal filter of the device. A refractive index increment (dn/dc) of 0.147 mL/g was determined experimentally and used for SEC-MALLS/RI determinations.

3.5. Physical properties in solution/dispersion

Three main physical properties of galactomannans in solution/dispersion, related to their industrial potential applications, were investigated.

3.5.1. Solubilization kinetics

Samples were prepared at a concentration of 0.5 % w/w on a dry weight basis at 25 °C and 80 °C, respectively for 5, 10, 30, 20, 120, 180 min and 15, 30, 60, 120, 180 min, under magnetic stirring. Then, the corresponding dispersion was centrifuged at 5000 g during 15 min to remove the insoluble material. The supernatant recovered and the final polymer concentrations were determined as total solids dried at 105 °C for 24 h in an air circulating oven. Percentage of solubilization was determined by the ratio between supernatant massic concentration and initial massic concentration.

3.5.2. Viscosity and viscoelasticity

Rheological properties of carob gum were characterized at 25 °C on carob gum dispersions prepared as follows: 1% on a dry weigh basis in distilled water at 90 °C, under mechanical stirring for 3 h and cooled to room temperature before measurements. Rheological measurements were performed using a rheometer (Anton Paar, Graz, Austria) equipped with a temperature control system and with a cone and plate geometry (4° cone angle, 50 mm plate diameter, 102 µm gap). Each sample (approximately 3 mL) was placed in the sensor system for measurement at 25 °C. Curves of shear stress (τ) as a function of the shear rate ($\dot{\gamma}$), were obtained with the following program: 300 s from 0.3 to 300 s⁻¹. The parameters of flow index (n) and consistency (K) are obtained by solving the equation of Herschel-Bulkley : $\tau = \tau_0 + K(\dot{\gamma})^n$ (made by *Gabriel Data Analysis-GDA* program); τ , τ_0 and $\dot{\gamma}$ are respectively the shear stress, the yield stress and the shear rate.

Oscillatory tests were performed at 25 °C using the same equipment. Variations in G' (dynamic elastic modulus), G'' (dynamic viscous modulus) and η^* (complex viscosity) were recorded as a function of frequency, thus obtaining the characteristic mechanical spectra. Frequency sweeps from 0.03 to 30 Hz were performed at constant strain within the linear viscoelastic range ($\gamma = 1$ Pa) as realised by [34]. All the measurements were performed at least in duplicate.

3.5.3. Gel formation in association with other polysaccharides

To study the formation of gels by galactomannans in association with another polysaccharide, xanthan was used. As described by [27], mixtures of xanthan (4 g/L) and galactomannans (2 g/L) are able to form a gel. Such mixtures were performed with GM25 and GM80 fractions, during 3 h under mechanical stirring. Two temperatures of dissolution were tested: 25 °C and 80 °C. After cooling to 20 °C, samples were analyzed with a TA-XT2 texture analyzer (Stable Micro-Systems, Haslemere, UK). Penetration experiments were performed “by means of a 15 mm diameter flat circular probe, penetrating twice for 5 s into the gel at a speed of 60 mm/min (penetration depth = 5 mm). The total work of penetration, indicated as the gel strength and taken as the surface obtained under the force deformation curve” [42], was averaged using 2 repeated determinations. Hardness is defined as the peak force during the first compression cycle [43].

4. Results and discussion

4.1. Chemical characterization

The purification process and the temperature fractionation developed here were efficient to remove impurities and to ensure high-quality galactomannan contents (confirmed by gas chromatography analysis) (Fig. 2). Indeed, GM25 and GM80 fractions were very pure and consisted exclusively in galactomannans (about 99.9%). After purification, proteins were found in the residual pellet (RP) after the second extraction and ashes were located in the filtrate. GM25 fraction, GM80 fraction, the pellet and the filtrate represented respectively 32.6%, 33.3%, 18% and 11% of the dry starting material. All results were presented in Table 1 wherein the data set to zero correspond to values below the limit of detection of the devices.

Table 1. Production yields of GM25 and GM80 fractions (as % of initial dry matter) and their chemical characterization.

	CLBG	GM25	GM80
Yields	100	32.57	33.25
Chemical composition			
<i>Protein</i>	6.00 ± 0.03	0.03 ± 0.02	0.03 ± 0.01
<i>Fat</i>	2.10 ± 0.11	0	0
<i>Ash</i>	0.31 ± 0.05	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.01
<i>Fiber</i>	2.20 ± 0.20	0	0
<i>Galactomannans¹</i>	89.39 ± 0.24	99.94 ± 0.02	99.94 ± 0.01

¹ Obtained by difference.

4.2. *Structural characterization*

To study the structure of GM25 and GM80 fractions, M/G ratio was determined and related to the distribution of galactosyl residues along the mannose main chain ("fine structure of galactomannan"). To allow a comparison of the obtained results (Table 2), measurements were also performed on two other contrasted galactomannans:

- A guar gum, much more substituted, with a more regular distribution of galactosyls residues (fewer "hairy" zones)
- An α -galactosidase-hydrolyzed crude locust bean gum (HCLBG). This enzyme eliminates easily accessible galactosyls residues (located between one or more free mannosyls residues). Thus, enzymatic attack avoids highly substituted areas because few binding sites are available.

M/G ratios were obtained by the method of Blakeney [40]. They indicated that guar gum is much more substituted (at least twice) than carob gums. GM25 and GM80 fractions had M/G ratios of 2.85 and 3.84 respectively. The ratio for GM80 was 1 unit higher than that of GM25. However, these two fractions presented lower ratios than that determined for CLBG (4.07). The RP of the purification process contained very low substituted galactomannans (M/G ratio = 4.50 – more than GM25 and GM80 fractions), which contribute significantly to the ratio value for crude gum (M/G ratio = 4.07). The action of α -galactosidase on crude locust bean gum seems thus quite effective since it increased the value of the M/G ratio from 4.07 to 5.98. This HCBLG fraction was very slightly substituted.

Analysis of $[^{13}\text{C}]$ -NMR spectra of these fractions can provide interesting information about fine structure of galactomannans. M/G ratios can also be determined by considering the intensities of C-1 mannose and galactose signals in $[^{13}\text{C}]$ -NMR spectra [9]. This method provides results relatively close to those obtained by Blakeney method [40] (Table 2).

Spectra also showed that resonance from C₄ of D-mannose residues were split, in evident dependence upon the nearest neighbour probabilities ("diad frequencies") of D-galactosyl groups along the mannan chains (Fig. 3). Diad frequencies were

obtained by integrating C₄(Man) peak areas. F11, F21/F12 and F22 gave respectively the di-, mono- or non-substituted mannose pair proportions (Table 2).

The percentages of total lateral substituents obtained by C₄(Man) peak analysis [F11 + (F21 or F12)/2] were fairly well correlated with M/G ratios. Thus, guar gum has a high proportion of di-substituted (F11) or mono-substituted (F12/F21) di-mannosyls and very few pairs without substituents. This makes sense since guar gum consists of a large proportion of side galactosyls residues (M/G = 1.5). Therefore consecutive “smooth” mannosyl residues remain limited. This gum has a fairly homogeneous profile. GM25 and GM80 fractions present a similar profile, different from guar gum. It indicates a much larger proportion of non-substituted di-mannosyls, explained by high M/G ratios. However, GM80 fraction has a higher proportion of F11 and F22 than GM25 while its M/G ratio is more important. This clearly indicates that the distribution of galactosyls on the mannose main chain does not respond to a simple statistical law. Hydrolyzed locust bean gum (HCLBG) also has a [¹³C]-NMR spectrum having the same morphology as GM25 and GM80 fractions. However the proportion of non-substituted pairs is much more important. Splitting of the C-6 substituted D-mannose resonance provides, therefore the basis for determining the next-nearest-neighbor probabilities (triad frequencies) (Fig. 3). However, the spectrum is not sufficiently resolved to accurately quantify and interpret the results. At this stage, it appears that particular distribution patterns may occur, since they can not be explained by the M/G ratio alone. However, it is nevertheless not possible to be sure of the localization of these non- mono- or di-substituted mannosyl pairs on the main chain. It is therefore necessary to use the determination of the degree of blockiness for more detailed informations on chemical structures.

Table 2. Fine structural characterization of different galactomannans: GM25, GM80, HCLBG and guar gum (Guar).

<i>Structural characterization</i>	<i>Guar</i>	<i>GM25</i>	<i>GM80</i>	<i>HCLBG</i>	<i>CLBG</i>	<i>RP</i>
M/G ratio (GC-FID) ¹	1.51 ± 0.01	2.85 ± 0.01	3.84 ± 0.01	5.98 ± 0.01	4.07 ± 0.03	4.50 ± 0.03
M/G ratio ([¹³C]-NMR) ²	1.70 ± 0.02	2.98 ± 0.04	3.50 ± 0.01	6.55 ± 0.04	/	/
Degree of blockiness (%) ³	40.00 ± 1.23	70.00 ± 2.04	83.00 ± 2.47	96.00 ± 3.15	/	/
F11 Diad Frequencies (%) ²	41.28 ± 1.25	12.35 ± 1.17	15.65 ± 0.28	6.13 ± 0.18	/	/
F12 or F21 Diad Frequencies (%) ²	46.53 ± 0.54	35.52 ± 0.95	30.35 ± 0.59	21.01 ± 1.49	/	/
F22 Diad Frequencies (%) ²	12.19 ± 0.71	52.10 ± 0.20	54.00 ± 0.31	72.85 ± 1.66	/	/

¹ [40] ; ² [9] ; ³ [20].

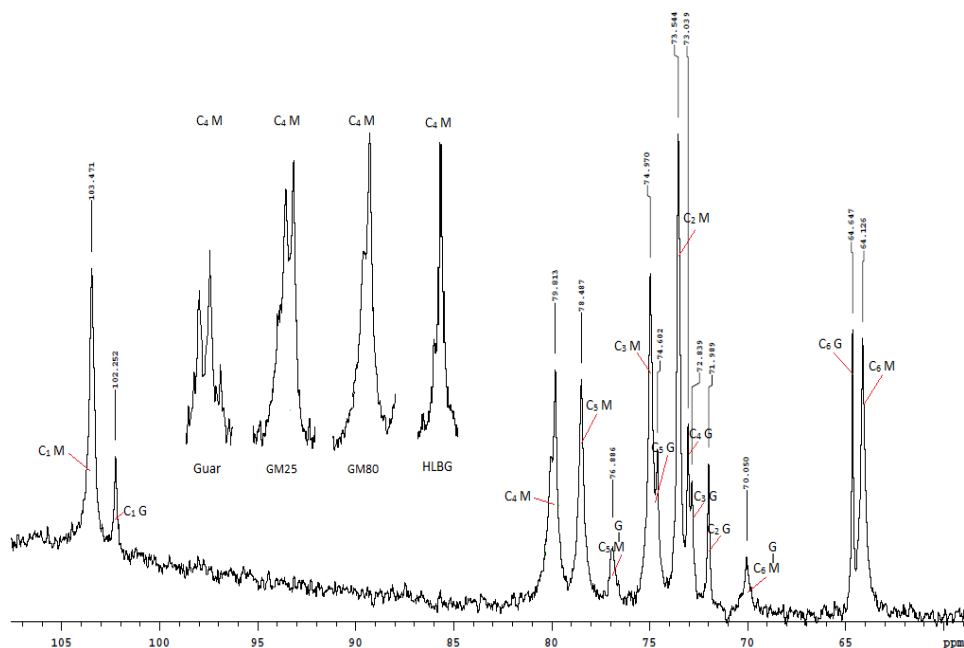


Figure 3. $[^{13}\text{C}]$ -NMR spectrum of different galactomannans: GM25, GM80, HCLBG and guar gum. Focus on mannosyl fourth carbon (C4).

The study of the degree of blockiness is focused on α -D-galactopyranosyl side-chain groups distribution. It was determined by measurement of *O*-acetyl-*O*-methyl-D-mannitol derivatives by GC-MS, which gives a characteristic of the distribution pattern in the parent galactomannan :

- D-mannopyranosyl units substituted at *O*-6 with α -D-galactopyranosyl groups and at *O*-4 by a D-mannopyranosyl group without substitution at *O*-6 will produce 1,5-di-*O*-acetyl-2,3,4,6-tetra-*O*-methyl-D-mannitol (**1**),
- whereas, if the D-mannopyranosyl attached at *O*-4 bears a D-galactopyranosyl group at *O*-6, this D-mannopyranosyl residue will give rise to 1,4,5-tri-*O*-acetyl-2,3,6-tri-*O*-methyl-D-mannitol (**2**).

Thus, if the α -D-galactopyranosyl groups are isolated from each other along the D-mannan backbone, compound (1) would result from the D-mannopyranosyl residues to which they are attached. On the other side, application of the reaction sequence to a “block type” of pattern of substitution would yield mainly compound (2), even if compound (1) would be present too (at the beginning of each block). The ratio between compounds (1) and (2) will give therefore the degree of blockiness of each sample, which represents the percentage of side galactosyls having at least one substituted mannosyl as neighbor. An important ratio therefore reflects a structure necessarily consisting of many successively substituted mannosyls (“blocks”) grouped in “hairy” regions.

Guar gum is highly substituted ($M/G = 1.51$) and it has therefore many di- or mono-substituted di-mannosyls. Determination of the degree of blockiness (Table 2) indicated yet that a small proportion of these pairs are contiguous. Indeed, only 40% of lateral substituents possess neighbors successively substituted (“blocks”). In contrast, carob samples, yet much less substituted, have a substantially higher proportion of side galactosyls arranged in “blocks” (70% for GM25), whereas such distribution reached 83% for GM80 and 96% for HCLBG. This indicates that the enzyme hydrolysed all “isolated” galactosyl substituents in the “smooth” or “densely substituted” areas, without being able to attack successively substituted residues. Proportion of non-substituted di-mannosyls therefore increased significantly. Again, the M/G ratio does not seem to be a sufficiently accurate parameter for structural characterization.

The chain length is also an important aspect of the structure. During polysaccharides analysis, the distribution of molecular weight measured is highly dependent on the sample preparation and measurement technique conditions [1]. A unique and absolute weight average molecular weight (M_w) therefore has little meaning. However, values obtained from identically prepared samples, analyzed by the same technique in the same conditions, can be compared among themselves. The results of fractions GM25, GM80 and CLBG determined by SEC-MALLS analyses in water or buffer, are presented in Table 3. Degrees of polymerisation (DP), polydispersity index (PI) and radii of gyration (R_g) were also presented.

Polydispersity index (PI) was determined by M_w/M_n ratio. In water, GM25 fraction had a higher M_w than GM80 fraction. It was also more polydisperse. However, CLBG had the highest M_w value (1018 kDa) and PI (1.56). Fairly similar

values were already determined by SEC coupled to triple detection [44]. CLBG is composed of a broad distribution of galactomannans, some with a very high Mw. These are excluded of GM25 and GM80 fractions and are found in the pellet (Fig. 2).

The same measurements were performed in phosphate buffer. The role of the buffer is to avoid any galactomannans self-association [45] or polymer aggregation [31]. GM25 fraction had a Mw value close to that obtained in water. The Mw value of CLBG determined in the buffer was considerably lower. This may evidence inter-chain hydrophobic interactions in water that artificially increased the value obtained. [31] already demonstrated such behavior, even at low concentrations. In contrast, the GM80 fraction exhibited higher Mw in the buffer than in water.

This phenomenon could be explained by the presence of intramolecular cooperative bonds in water (and not inter-chain), generated by a rearrangement of hydrophobic regions in the galactomannans. These bonds would disappear in buffer, thereby increasing hydrodynamic volume and Mw. The buffered medium could also promote dissolution and thus help to keep a part of galactomannans – probably the longest – solubilized, than they would not be in water.

The results obtained in the buffer seem to be the most robust and representative of reality, since under these conditions, Mw value of CLBG (770 kDa) was between the low values of GM25 fraction (760 kDa) and higher values of GM80 fraction (910 kDa). The CLBG is highly polydisperse ($PI = 1.23$) while the two others fractions had a more narrow distribution. The degree of polymerization (DP) of GM80 is also higher than GM25 fraction. DP can however be adjusted for the M/G ratio. It is thus possible to estimate the average length of the mannose main chain of GM25, GM80 and CLBG fractions. They were respectively equivalent to 3480, 4465 and 3825 mannosyls residues. The radii of gyration (R_g) were also determined. It is the average distance between one end of the chain and the center of mass of the structure. The GM80 fraction had the highest value of R_g (107 nm). This is in accordance with a study through computer prediction showing that richest galactomannans in long and "smooth" regions have a more extended random coil conformation in aqueous solution [46].

Table 3. Structural data of GM25 and GM80 solutions (0.5 mg/mL) determined at 40 °C by SEC-MALLS : weight average molecular weight (M_w), number average molecular weight (M_n), polydispersity index (PI), radius of gyration (R_g).

	<i>Water</i>			<i>Phosphate buffer</i>		
	GM25	GM80	CLBG	GM25	GM80	CLBG
M_w (kDa)	736.7 ± 15.1	699.6 ± 49.5	1017.9 ± 162.8	761.1 ± 9.3	911.3 ± 54.2	772.2 ± 9.8
M_n (kDa)	590.3 ± 15.1	636.5 ± 52.6	696.7 ± 86.2	655.9 ± 13.9	897.7 ± 67.2	631.7 ± 12.9
DP_w[*]	4548 ± 93	4319 ± 306	6283 ± 1005	4698 ± 57	5625 ± 335	4767 ± 60
DP_n[*]	3644 ± 155	3929 ± 325	4307 ± 532	4049 ± 86	5541 ± 415	3899 ± 80
PI	1.25 ± 0.03	1.10 ± 0.04	1.46 ± 0.07	1.16 ± 0.03	1.02 ± 0.02	1.23 ± 0.04
<R_g>_w	91.8 ± 1.5	94.2 ± 3.4	99.2 ± 2.5	91.7 ± 1.7	106.9 ± 4.2	89.3 ± 2.8
<R_g>_n	100.1 ± 1.5	100.6 ± 1.5	107.6 ± 2.3	98.2 ± 2.2	109.5 ± 3.5	96.4 ± 4.0

^{*}equivalent hexose units

The fractionation process thus generated two fractions of different chemical structures, for which a schematized structure is proposed on Fig. 4: the GM25 fraction consisted of galactomannans composed of shorter chains, richer in galactosyl, which were distributed at 70% inside “block” structures (grouped in “hairy” regions); The GM80 fraction consisted of longer galactomannans less substituted in galactosyls, although these were concentrated to 83% as substituted blocks (also grouped in “hairy” regions).

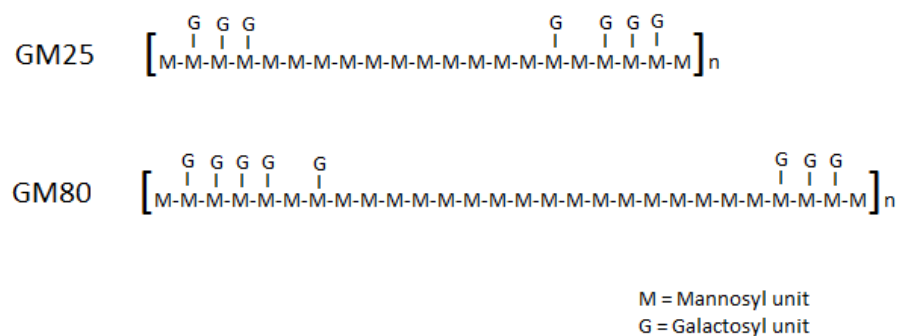


Figure 4. Plausible schematic representation of GM25 and GM80 fractions structures. M and G are respectively mannosyl and galactosyl units.

4.3. Physical Properties

4.3.1. Solubilization kinetics

LBG is an amorphous polymer and its solubility is not dependent on a fusion of crystalline areas. Rather, it is the result of thermodynamic partitioning based on a classical polymer-solvent fractionation, a mechanism that applies only for polysaccharide components with M/G ratio > 2.85 [44, 47]. Several studies have been focused on the impact of M/G ratio and MW on solubility [32, 44, 47, 48]. These studies indicate that a high galactose substitution and low molecular weights

improve the dissolution. Galactomannans with longer chain lengths and poorer in galactose require higher temperatures or longer time to be completely dissolved in water.

The results presented in Fig. 5A are in line with this. GM25 and GM80 fractions dissolve very quickly at 80 °C, as 85-90% yields were obtained in 5 min. Then, solubilization increased more slowly to 95-100% after 180 min. At this solubilization temperature, GM25 fraction was still slightly more soluble than the GM80 fraction, for all the dissolution times. However, extraction yields depended on how GM25 and GM80 fractions were obtained (air drying, grinding, etc.) and, therefore, on their ability to disperse in water [44]. At a working temperature of 25 °C, GM25 fraction dissolved much more slowly. However, it reached a yield of 90% after 3 h of dissolution. Under these conditions the GM80 fraction remained insoluble.

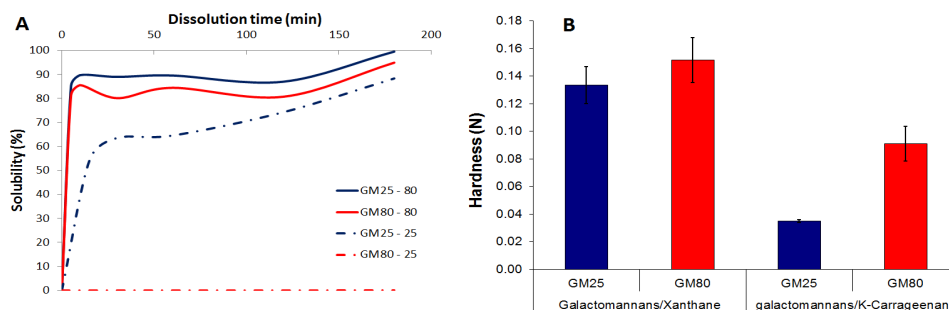


Figure 5. A. Evolution of GM25 and GM80 solubility during dissolution time. Dissolution temperatures of 25 °C and 80 °C are shown respectively with dotted and continuous lines. B. Hardness (N) of galactomannan/xanthan (1:2) and galactomannans/carrageenan (1:2) gels generated at 80 °C (6 g/L). Comparison between GM25 and GM80 fractions.

The results presented in Fig. 5 are not surprising because GM25 and GM80 fractions were extracted respectively at 25 °C and 80 °C. It seems logical that they are resolubilized to these respective working temperatures. GM80 which is rich in smooth areas, was nevertheless completely insoluble for each dissolution time at 25 °C. The greater presence of galactose or shorter chains may therefore limit intra- and inter-molecular (H-bonds) interactions that lead to aggregation and precipitation of GM80 in these conditions.

4.3.2. Viscosity and viscoelasticity

Apparent viscosity and mechanical spectrum of dispersions can be studied in semi-dilute conditions. Fig. 6A presents steady shear viscosity profiles of GM25 and GM80 fractions. This graph shows the relationship between apparent viscosity η (Pa.s) and shear rate (s^{-1}). The viscosity generated by galactomannans dispersions is due to two distinct factors: i) the interpenetration of the macromolecular chains leading to the creation of "physical" non-specific recovery; ii) the presence of more specific interactions between macromolecules resulting from intermolecular aggregation phenomena: the hyper-entanglements [1]. Apparent viscosity of a dispersions in semi-dilute conditions is therefore related to the molecular structure that influences possibilities of interactions [32, 49, 50].

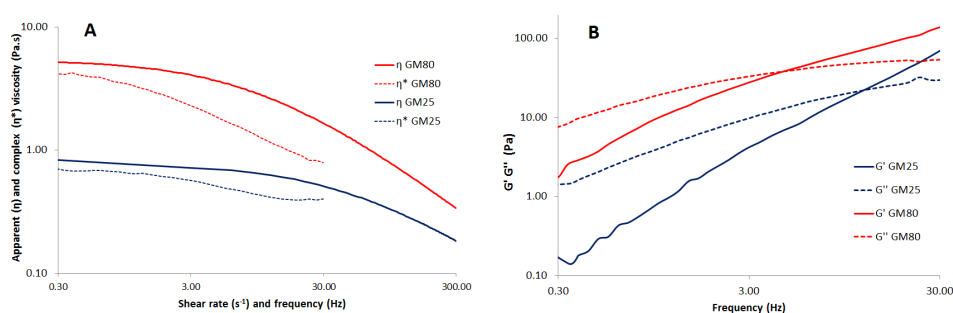


Figure 6. A. Steady shear viscosity profile of GM25 and GM80 dispersions (1%). B. Mechanical spectra of GM25 and GM80 dispersions (1%).

Both fractions studied showed a shear thinning behavior (or pseudoplastic). This means that the apparent viscosity decreased as the shear rate increased. Under imposed shear stress, macromolecules are disentangled more or less quickly – depending on entanglements density and of interactions strength – to end up oriented in the direction of the flow. This macromolecules reorganization results in a decrease of viscosity. Although the shear thinning effect is much stronger for the GM80 fraction ($n_{GM80} = 0.333$ and $n_{GM25} = 0.389$), it possesses a greater apparent viscosity η on the range of shear rates tested ($K_{GM80} = 17.838$ and $K_{GM25} = 7.227$). It is therefore possible to conclude that the molecular structure of the GM80 fraction promotes such intermolecular (aggregation) interactions and therefore hyper-entanglements.

The study of viscoelastic properties is one of the main techniques to highlight entanglements. The viscoelastic behavior of a solution/dispersion is also influenced by the structure of polymers. The mechanical spectra of GM25 and GM80 fraction dispersions are shown in Fig. 6B. The graph is typical of galactomannans in semi-dilute conditions that are viscoelastic fluids generating an entangled network. The loss modulus G'' (Pa) is greater than the storage modulus G' (Pa) at low oscillation frequencies, whereas the reverse is observed at higher frequencies. Beyond the shift point, the oscillation frequency becomes too high and galactomannans chains can not be dissociated. The GM80 fraction had a much stronger viscoelastic behavior and greater dynamic (complex) viscosity η^* than GM25 fraction (Fig. 6A) whose G' and G'' are lower. The intersection between G' and G'' curves was shifted at lower frequencies for GM80 fraction. This means that it quickly had an elastic dominance behavior generated by entanglements and hyper-entanglements which dissociate less easily.

The relationship between apparent viscosity (η) and complex viscosity (η^*) can also be studied as shown on Fig 6A. Superimposability of the two viscosities – known as the Cox-Merz rule [51] – is satisfied for the random coil polysaccharides in which the rheological behavior is controlled by simple physical entanglements (recovery) [15]. A greater η^* than η is characteristic of a weak gel [52], while the deviation observed in Fig. 6A is probably due to different types of molecular rearrangement occurring in the two flow patterns over the applied shear rate or frequency range [53]. These rearrangements can be attributed to more specific molecules associations for larger timescale or hyperentanglements than non-specific physical entanglements [50]. These phenomena are more pronounced for the GM80 fraction for which the η^* curve has a greater deviation than GM25. Both dispersions of galactomannans fractions therefore don't behave as ideal viscoelastic fluids. However, the GM80 fraction structure generated a denser and tougher network, characterized by stronger intermolecular interactions and many more hyperentanglements.

4.3.3. Formation of associative gels

When xanthan, galactomannans or carrageenan alone are dissolved at the same concentration as in the mixed gels or at the total concentration of the gels, they do not generate gels. Each fraction alone – regardless of the solubilization temperature – exhibits strength gels near 0.02 N. Only mixed gels are able to generate positive synergies, even when mixed gels are dissolved at 25 °C. In those conditions GM25 and GM80 fractions have gel strengths respectively of 0.06 N and 0.03 N. It is therefore possible to generate a gel, even at lower temperatures and under conformational transition temperature of xanthan. The GM80 fraction which is probably not dissolved at 25 °C, presented lower values. Fig. 5B shows the measured force (N) or hardness of mixed gels between GM80 or GM25 fractions and xanthan or carrageenan. Stronger gels were obtained by combining galactomannans in xanthan. The GM80 fraction generated stronger gels (0.152 N) when associated with xanthane at 80 °C. The concentration of solutions, dispersions or gels was invariable. Thus, only the structural characteristics can explain the differences observed in gel formation behavior. Some authors demonstrated a positive correlation between the storage modulus G' of a mixed galactomannan/xanthan gel and the amount of "smooth regions" established in the galactomannan, but they have not been able to determine whether these smooth regions are involved in the junction areas with xanthan [5]. GM25 and GM80 mixed gels with xanthan seemed to follow the same trend because GM80 fraction – the most organized in "blocks" – generated the strongest gels.

These findings accredit model proposed by [27, 54] wherein interactions between xanthan and galactomannans may be due to two distinct mechanisms. The first occurs at room temperature, giving weak and brittle gels, and is relatively independent of the galactose content of galactomannans. The second mechanism requires higher temperatures to form strong gels highly dependent on galactose composition. Both mechanisms can coexist.

The same findings also arise from the observation of mixed GM25 or GM80/carrageenan gels, although they are weaker. Structure of GM80 fraction appears again to generate stronger interactions with other polysaccharides.

5. Conclusions and perspectives

The choice of the purification/fractionation temperature has a great influence on the average chemical structure of the clarified gum obtained. Both GM25 and GM80 fractions have close structural features but are nevertheless different enough to generate distinct behaviors in solution or dispersion. Typically, galactomannans obtained by extraction at 80 °C presented a greater viscosity, a more elastic behavior and formed stronger gels in aqueous dispersion. It seems thus that a slight increase in chain lengths, M/G ratios and degree of blockiness, favored the appearance of intra- and inter-chain interactions. These interactions are responsible for precipitation at low temperatures and responsible for the creation of hyper-entanglements and a stronger network when solubilizing temperatures increase progressively. The pattern of substituents distribution seems to be the most important parameter that determines the behavior of a galactomannan in aqueous solution. Its knowledge (in addition to the molecular weight and the degree of galactose substitution) will predict the properties of the gum (or a fraction thereof), and specific applications that could be targeted. A gum fractionated at low temperature may thus enter the composition of mixtures in which the heating is excluded and rapidly bring it viscosity due to its “cold” solubilization. Conversely, a fraction like GM80 would be preferred for the formulation of highly viscous solutions or strong gels, where the temperature increase is permitted.

Based on measurements carried out by solubility determination, rheometer and texture analyzer, an objective determination of which mechanisms and which parts of the structure are involved in interactions is not possible. However, many models suggest that “smooth” regions are responsible of intra-chain, inter-chain and intermolecular interactions, although it was not clearly demonstrated [3, 33-37]. To go one step further and to be able to settle this debate, it would be interesting to test our different samples in solid-state NMR. Recent studies have indeed assumed that differences in mobility observed on NMR spectra between hexose polymers would be explained by the presence of molecular interactions located on these hexoses [55]. It would therefore be possible to establish a correlation between the percentage of smooth areas and the percentage and nature of the least mobile hexoses, and see if the proposed models are verified.

On the other hand, it could be interesting to split the CLBG fraction into other fractions to have a finer observation panel of structure-function relationship of galactomannans obtained by purification. Some studies have thus demonstrated an increase in the M/G ratios and chain lengths as the purification temperature increases gradually [23, 31, 44, 53, 56]. It would be interesting to complete these results by the determination of other structural characterization parameters such as degree of blockiness and diad (or triad) frequencies. Combinations of GM25 and GM80 in varying proportions may also be studied in order to obtain mixtures of original properties for certain applications.

Acknowledgements

Authors thank Mrs. I. Vandevreken for technical assistance.

6. References

- [1] Gillet, S., Blecker, C., Paquot, M., & Richel, A. (2014a). Chemical structure – physical properties of galactomannans extracts from locust bean. *Comptes Rendus de Chimie*, In press
- [2] McCleary, B. (1980). Hydrolysis of galactomannans by α -D-galactosidase and β -D-mannanase. In “*mechanisms of saccharide polymerization and depolymerisation*”. J. John. Marshall, Ed. Academic Press N.Y., pp. 285-300.
- [3] Dea, I., & Morrison, A. (1975). Chemistry and interactions of seed galactomannans. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry* 31, 241-312.
- [4] Baker, C., & Whistler, R. (1975). Distribution of d-galactosyl groups in guaran and locust bean gum. *Carbohydrate Research* 45, 237-243.
- [5] Daas, P., Grolle, K., van Vliet, T., Schols, H., & De Jong, H. (2002). Toward the recognition of structure-function relationships in galactomannans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 4282-4289.
- [6] Grasdalen, H., & Painter, T. (1980). N.M.R. studies of composition and sequence in legume-seed galactomannans. *Carbohydrate Research* 81, 59-66.
- [7] Izydorczyk, M., & Biliaderis, C. (1996). Grandient ammonium sulphate fractionation of galactomannans. *Food Hydrocolloids* 10, 295-300.
- [8] Lazaridou, A., Biliaderis, C., & Izydorczyk, M. (2000). Structural characteristics and rheological properties of locust bean galactomannans : a comparaisn of samples from different carob tree populations. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 81, 68-75.
- [9] Manzi, A., Ceredo, A. & Shoolery, J. (1986). High resolution ^{13}C -N.M.R. spectroscopy of legume seed galactomannans. *Carbohydrate Research* 148, 189-197.
- [10] McCleary, B. (1979). Enzymic hydrolysis, fine structure, and gelling interaction of legume seed D-galacto-D-mannans. *Carbohydrate Research* 71, 205-230.
- [11] Painter, T., Gonzalez, J., & Hemmer, P. (1979). The distribution of D-galactosyl groups in guaran and locust bean gum : new evidence from periodate oxidation. *Carbohydrate Research* 69, 217-226.

- [12] Lopes da Silva, J., & Gonçalves, M. (1990). Studies on a purification method for locust bean gum by precipitation with isopropanol. *Food Hydrocolloids* 4, 277-287.
- [13] Kawamura, Y. (2008). *Carob bean gum (Chemical and Technical Assessment for the 69th JECFA)*, http://www.fao.org/fileadmin/templates/agis/pdf/jecfa/cta/69/Carob_bean_gum.pdf, (08/05/12).
- [14] McCleary, B., & Matheson, N. (1974). A-D-galactosidase activity and galactomannan and galactosylsucrose oligosaccharide depletion in germinating legume seeds. *Phytochemistry* 13, 1747-1757.
- [15] Andrade, C., Azero, E., Luciano, L., & Goncalves, M. (1999). Solutions properties of the galactomannans extracted from the seeds of *Caesalpinia pulcherrima* and *Cassia javanica*: comparaison with locust bean gum. *International Journal of Biological Macromolecules* 26, 181-185.
- [16] Azero, E., & Andrade, C. (2002). Testing procedure for galactomannan purification. *Polymer Testing* 21, 551-556.
- [17] Rafique, C., & Smith, F. (1950). The constitution of guar gum. *Journal of American Chemical Society* 72, 4634-4637.
- [18] Andrews, P., Hough, L., & Jones J. (1952). Mannose-containing Polysaccharides. I. The galactomannans of Lucerne and Clover Seeds. *Journal of American Chemical Society* 74, 4029-4032.
- [19] Kapoor, V. (1972). A galactomannan from the seeds of *delonix regia*. *Phytochemistry* 11, 1129-1132.
- [20] Barker, S., Stacey, M., & Zweifel, G. (1957). The separation of neutral polysaccharides. *Chemical Industry* 11, 330-334.
- [21] McCleary, B. (1988) Guar and carob galactomannans. *Methods Enzymology* 160, 523-527.
- [22] Wielinga, W. (1990) *Production and application of seed gums*. In Phillips, & Williams eds. *Gums and Stabilisers for the Food Industry* 5, 383-403. Oxford : IRL Press.
- [23] Gaisford, S., Harding, S., Mitchell, J., & Bradley, T. (1986). A comparison between the hot and cold water soluble fractions of two locust bean gum samples. *Carbohydrate Polymers* 6, 423-442.
- [24] Kök, S. (2007). A comparative study on the composition of crude and refined locust bean gum: In relation to rheological properties. *Carbohydrate Polymers* 70, 68-76.

- [25] Pollard, M., & Fischer, P. (2006a). Partial aqueous solubility of low galactose-content galactomannans – What is the quantitative basis? *Current Opinion in Colloid and Interface Science* 11, 184-190.
- [26] Tako, M., Asato, A., & Nakamura, S. (1984). Rheological aspects of the intermolecular interaction between xanthan and locust bean gum in aqueous media. *Agricultural and Biological Chemistry* 48(12), 2995-3000.
- [27] Bresolin, T., Milas, M., Rinaudo, M., & Ganter, J. (1998). Xanthan–galactomannan interactions as related to xanthan conformations. *International Journal of Biological Macromolecules* 23, 263-275.
- [28] Dakia, P., Wathelet, B., & Paquot, M. (2010). Influence de la teneur en galactose sur les interactions moléculaires et sur les propriétés physico-chimiques des galactomannanes en solution. *Biotechnology Agronomy Society Environment* 14, 213-223.
- [29] Dea, I., Clarck, A., & McCleary, B. (1986). Effect of the molecular fine structure of galactomannans on their interaction properties – the role of unsubstituted sides. *Food Hydrocolloids* 1, 129-140.
- [30] Monteiro, S., Rebelo, S., de Cruz e Silva, O., & Lopes da Silva, J. (2013). The influence of galactomannans with different amount of galactose side chains on the gelation of soy proteins at neutral pH. *Food Hydrocolloids* 33, 349-360.
- [31] Richardson, P., Willmer, J., & Foster, T. (1998). Dilute properties of guar and locust bean gum in sucrose solutions. *Foods Hydrocolloids* 12, 339-348.
- [32] Rinaudo, M. (2001). Relation between the molecular structure of some polysaccharides and original properties in sol and gel states. *Food Hydrocolloids* 15, 433-440.
- [33] Cheetham, N., & Mashimba, E. (1988). Conformational aspects of xanthan-galactomannan gelation. *Carbohydrate Polymers* 9, 195-212.
- [34] Dakia, P., Blecker, C., Robert, C., Wathelet, B., & Paquot, M. (2008). Composition and physicochemical properties of locust bean gum extracted from whole seeds by acid and water dehulling pre-treatment. *Food Hydrocolloids* 22, 807-818.
- [35] Dea, I., McKinnon, A., & Rees, D. (1972). Tertiary and quaternary structure in aqueous polysaccharide systems which model cell wall cohesion: reversible changes in conformation and association of agarose, carrageenan and galactomannans. *Journal of Molecular Biology* 68, 153-172.
- [36] Dea, I., Morris, E., Rees, D., Welsh, S., Barnes, H., & Price, J. (1977). Association of like and unlike polysaccharides: mechanism and specificity in

galactomannans, interacting bacterial polysaccharides, and related systems. *Carbohydrate Research* 57, 249-272.

[37] Doublier, J., & Launay, B., (1981). Rheology of galactomannan solutions : a comparative study of guar gum and locust bean gum. *Journal of Texture Studies* 12, 151-172.

[38] Anderson, D. (1986). Nitrogen conversion factors for the proteinaceous content of gums permitted as food additives. *Food Additives and Contaminants* 3, 225–230

[39] Van Soest, P. (1963). Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. II. A rapid method for the determination of fiber and lignin. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* 46(5), 829–835.

[40] Blakeney, A., Harris, P., Henry, R., & Stone, B. (1983). A simple and rapid preparation of alditol acetates for monosaccharide analysis. *Carbohydrate Research* 113, 291-299.

[41] Viebke, C. (1995). A light scattering study of carrageenan/galactomannan interactions. *Carbohydrate Polymers* 28, 101-105.

[42] Van Camp, J., & Huyghebaert, A. (1995). High pressure-induced gel formation of whey protein and haemoglobin protein concentrate. *LWT – Food Science and Technology* 28(1), 111-117.

[43] Blecker, C., Paquot, M., & Deroanne, C. (2000). Gelling properties of whey proteins after enzymic fat hydrolysis. *Journal of Food Science* 65(4), 561-563.

[44] Pollard, M., Kelly, R., Wahl, C., Fisher, P., Windhab, E., Eder, B., & Amado, R. (2007). Investigation of equilibrium solubility of a carob galactomannan. *Food Hydrocolloids* 21, 683-692.

[45] Morris, E. (Ed.), (1990). Mixed polymer gels. In P. Harris, *Food Gels* (pp. 291-360). London : Elsevier Applied Science.

[46] Petkowicz, C., Reicher, F., & Mazeau, K. (1998). Conformational analysis of galactomannans: from oligomeric segments to polymeric chains. *Carbohydrate Polymers* 37, 25-39.

[47] Gillet, S., Simon, M., Paquot, M., & Richel, A. (2014b). Review of the influence of extraction and purification process on the characteristics and properties of locust bean gum. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment* 18(1), In press

[48] Pollard, M., Kelly, R., Fischer, P., Windhab E.J., Eder, B., & Amadó, R. (2008). Investigation of molecular weight distribution of LBG galactomannan for flours prepared from individual seeds, mixtures, and commercial samples. *Food Hydrocolloids* 22, 1596-1606.

- [49] Kapoor, V., Milas, M., Taravel, F., & Rinaudo, M. (1994). Rheological properties of seed galactomannan from *Cassia nodosa*. *Carbohydrate Polymers* 25, 79-84.
- [50] Morris, E., Cutler, A., Ross-Murphy, S., & Rees, D. (1981). Concentration and shear rate dependence of viscosity in random coil polysaccharide solutions. *Carbohydrate Polymers* 1, 5-21.
- [51] Cox, W., & Merz, E. (1958). Correlation of dynamic and steady flow viscosities. *Journal of Polymer Science* 28(118), 619-622.
- [52] Kulicke, W., & Porter, R., (1980). Relation between steady shear flow and dynamic rheology. *Rheologica Acta* 19, 601-605.
- [53] Richardson, R., & Ross-Murphy, S. (1987). Non-linear viscoelasticity of polysaccharide solutions. 2: Xanthan polysaccharide solutions. *International Journal of Biological Macromolecules* 9, 257-264.
- [54] Mannion, R., Melia, C., Launay, B., Cuvelier, G., Hill, S., Harding, S., & Mitchell, J. (1992). Xanthan/locust bean gum interactions at room temperature. *Carbohydrate Polymers* 19, 91-97.
- [55] Vieira, M., & Gil, A. (2005). A solid state NMR study of locust bean gum galactomannan and konjac glucomannan gels. *Carbohydrate Polymers* 60, 439-448.
- [56] McCleary, B., Clark, A., Dea, I., & Rees, D. (1985). The fine structures of carob and guar galactomannans. *Carbohydrate Research* 139, 237-260.

6

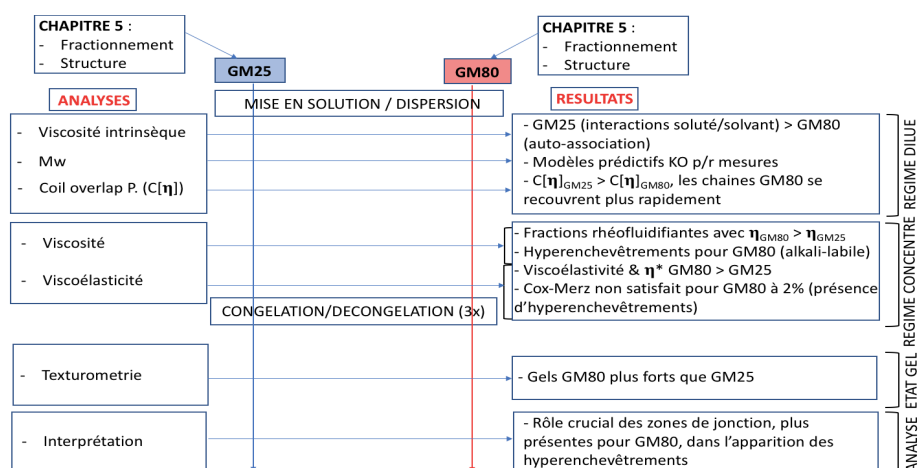
Structure impact of two galactomannan fractions on their viscosity properties in dilute solution, unperturbed state and gel state

Gillet, S., Aguedo, M., Petrut, R., Olive, G., Anastas, P., Blecker, C., & Richel, A. (2017) Structure impact of two galactomannan fractions on their viscosity properties in dilute solution, unperturbed state and gel state. *International Journal of Biological Macromolecules*, 96.

Note introductive

Le chapitre précédent (5) permet d'établir une caractérisation structurale complète de deux fractions de galactomannanes issues de la gomme de caroube (GM25 et GM80). Leurs structures ont ensuite été mises en relation avec certaines propriétés physiques, dont quelques mesures rhéologiques, afin d'établir l'impact de la structure sur les propriétés en solutions aqueuses. L'approche rhéologique était toutefois sommaire et lacunaire, et ne permettait pas une analyse exhaustive des propriétés rhéologiques, en lien avec la structure.

Ce chapitre vise à établir de façon beaucoup plus complète les liens entre les différences de structures des fractions GM80 et GM25 et leurs propriétés de viscosité sur une large gamme de concentrations : le régime dilué, le régime concentré et l'état gel. Les propriétés de viscosité ont été spécifiquement ciblées, au détriment d'autres propriétés technofonctionnelles, car il s'agit des principales propriétés d'usage des galactomannanes au niveau industriel. Elles autorisent par ailleurs une mise en relation avec les caractéristiques structurales et peuvent être discutées en regard des nombreux modèles prédictifs dont la littérature regorge. Elles apparaissent dès lors beaucoup plus intéressantes afin d'aborder la thématique traitée (qui ne visait pas directement le développement d'applications). L'approche abordée pour traiter cette thématique, ainsi que les principaux résultats qui en découlent sont représentés au schéma ci-dessous. L'objectif poursuivi est d'évaluer l'impact de petites différences de structure sur le comportement de ces macromolécules et ainsi améliorer les connaissances sur les phénomènes macromoléculaires qui régissent la viscosité des polymères de type 'coil'.



1.	Abstract	145
2.	Introduction	145
3.	Materials and Methods	147
3.1.	Materials	147
3.2.	Viscosity and physical properties in solution/dispersion	147
3.2.1.	Intrinsic viscosity and coil overlap parameter.	147
3.2.2.	Viscosity and viscoelasticity	148
3.2.3.	Analysis of hydrogels with the texture analyzer	149
4.	Results & discussions	149
4.1.	Structural characterization	149
4.2.	Behavior in dilute solution	150
4.3.	Behavior in unperturbed state	160
4.4.	Behavior in gel state	168
5.	Conclusions and perspectives	170
6.	References	172

1. Abstract

The present study aims to establish links between the structural differences of two fractionated carob galactomannans samples (99.9% pure), previously fully characterized, and their viscosity properties over a wide range of polymer concentrations, under: (i) dilute solutions; (ii) unperturbed state; (iii) gel state. The objective is to assess the impact of small structural differences on the physical behavior of these macromolecules and thus to improve the global knowledge about the macromolecular phenomena that determine coil polymer viscosity, as well as the structure-function relationship of galactomannans and their potential industrial applications.

2. Introduction

Locust bean gum (LBG) is a food additive (E410) used mainly in the industry for its rheological, texturing and gelling properties [1]. LBG is made from the endosperm of the seeds of the carob tree (*Ceratonia siliqua* L.). The endosperm is composed of reserve polysaccharides (hemicelluloses) called galactomannans. Galactomannans consist of a β -(1 \rightarrow 4)-D-mannopyranosyl backbone substituted to varying degrees at α -(1 \rightarrow 6) with single D-galactopyranosyl residues [2]. The basic structure is the same for all galactomannans. Three elements, however, allow distinction between these polysaccharides: (i) the degree of galactose substitution (DS_{Gal}), (ii) the molecular weights, and (iii) the distribution pattern of galactosyl substituents along the main chain of mannans [3]. The fine structure of galactomannans of locust bean is most likely composed of "smooth" zones (lowly substituted) and "hairy" zones, i.e. much denser in side-galactosyls, without being systematically adjacent [4]. In the industrial production process of LBG [5], the purification step has a major influence on the composition and properties of gums. During clarification, the dissolution temperature is a crucial parameter which influences the average chemical structure of the resulting gum, also correlated to the viscosity observed in aqueous solution or dispersion [1]. In dilute solutions, the intrinsic viscosity is influenced by the fine chemical structure of galactomannans [4], itself defining the conformation of the polymer coil. The degree of space

occupancy of a coil present in a polymer solution at a given concentration (C) may be characterized by the dimensionless “coil overlap parameter” $C[\eta]$ [6]. Double logarithmic plots of specific viscosity (η_{sp}) versus $C[\eta]$ for a range of random coil polysaccharides were found to closely superimpose over one another, and fall into two linear regions, with an abrupt change in slope, when critical concentration C^* is reached. C^* depends on the hydrodynamic volume and corresponds to the transition from dilute to semi-dilute solutions, when concentration increases. It appears that the volume occupied by the isolated polymer coils decreases with concentration. At concentrations greater than C^* , the polymer coils compress. This compression continues until the polymer chains have reached their limiting size at C^{**} , providing a regime called unperturbed state [7]. At $C > C^{**}$ the limited size coils have to interpenetrate more and more [8]. The existence of this second transition at C^{**} , which marks the onset of the concentrated regime, was predicted from scaling arguments by de Gennes [9]. The magnitude of these two transitions will therefore depend upon solvent quality as well as hydrodynamic volume, with more chains increasing the breadth of the semi-dilute region [10]. The distinction between C^* and C^{**} is however not always visible graphically [11] and the transition between the dilute and the concentrated regimes is then generally designated by C^* . Thus in concentrated regime, an increasing concentration in polymers promotes the overlapping of the macromolecular chains and the appearance of entanglement [12]. In these concentrated states other approaches are needed to study the behavior of polymers such as the dynamic viscosity or the viscoelasticity. A viscous solution of LBG can finally generate a gel state when the polymer concentration in the concentrated regime increases or when a contracted hydrogel is formed after the solution was subjected to several freeze-thaw cycles [13, 14, 15].

The present study aims to establish links between the structural differences of two fractionated carob galactomannans samples (99.9% pure), previously fully characterized, and their viscosity properties over a wide range of polymer concentrations, under: (i) dilute solutions; (ii) unperturbed state; (iii) gel state. The objective is to assess the impact of small structural differences on the physical behavior of these macromolecules and thus to improve the global knowledge about the macromolecular phenomena that determine coil polymer viscosity, as well as the structure-function relationship of galactomannans and their potential industrial applications.

3. Materials and Methods

3.1. *Materials*

Crude locust bean gum (CLBG) was obtained from PFW Ltd. (Greenford, UK) as the product sold under the trade mark name HERCOGUM N1. All others chemicals were purchased from commercial suppliers and used as received. A purified hot extract (GM80) and a purified cold extract (GM25) were obtained respectively from 80 °C and 25 °C subtractive fractionation treatment of the CLBG sample. Fractionation, analyses of composition and structures determination have been carried out for and as describe in our previous study [4], resulting in two fully-characterized-fractions that were used as starting material in the present study.

3.2. *Viscosity and physical properties in solution/dispersion*

Three main physical properties of galactomannans in solution/dispersion, which are of interest for industrial potential applications, were investigated.

3.2.1. **Intrinsic viscosity and coil overlap parameter.**

The specific viscosity (η_{sp}) of a polymer is a dimensionless characteristic: $\eta_{sp} = (\eta_o - \eta_s)/\eta_s$ (Eq. 1), where η_s is the viscosity of the solvent in the absence of polymer and η_o is the viscosity of the solution containing a given concentration of dissolved polymer. The intrinsic viscosity $[\eta]$ (mL/g) is defined as follows: $[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0}(\eta_{sp}/C)$ (Eq. 2). To determine $[\eta]$, dilute solutions (0.01 – 0.50 g/100 mL) of LBG were prepared by mixing the appropriate amount of GM25 and GM80 fractions in distilled water at 90 °C, under mechanical stirring for 3 h and cooled to room temperature before measurements at 25 °C. Specific viscosities (η_{sp}) were measured with a Desreux-Bischoff capillary viscosimeter. The Huggins equation was applicable and was used to calculate the intrinsic viscosities $[\eta]$: $\eta_{sp}/C = [\eta] + \lambda_H[\eta]^2C$ (Eq. 3.), where C is the concentration and λ_H the Huggins constant. Another relation, the Kraemer equation, based on the relative viscosity (η_r), in dilute

solutions where the specific viscosity is much less than 1, may be constructed: $\ln(\eta_r)/C = [\eta] + \lambda_K[\eta]^2C$ (Eq. 4), where λ_K is the Kraemer constant. A plot of the inherent viscosity, extrapolated to zero concentration, yields the intrinsic viscosity $[\eta]$. Values of intrinsic viscosity were used to construct a double-logarithmic plot of specific viscosity versus $C[\eta]$ to determine the transition at the critical concentration (C^*) between the dilute and the concentrated regimes - which is characteristic of many polymer solutions - and the scaling laws obtained by the slopes of the regression lines of semi-dilute and dilute solution.

3.2.2. Viscosity and viscoelasticity

Rheological properties of carob gum were characterized at 25 °C on carob gum dispersions prepared as follows: 0.5%, 1% and 2% on a dry weight basis in distilled water, 1 M NaOH or 1 M NaCl at 90 °C, under mechanical stirring for 3 h and cooled to room temperature before measurements. Rheological measurements were performed using a rheometer MCR 302 (Anton Paar, Graz, Austria) equipped with a temperature control system and with a cone and plate geometry (0.996° cone angle, 49.975 mm plate diameter, 102 μ m gap). Each sample (approximately 3 mL) was placed in the sensor system for measurement at 25 °C. The dynamic viscosity η (Pa.s) of semi-dilute solutions is defined as followed $\eta = \tau/\dot{\gamma}$ (Eq. 5) with τ the shear stress (Pa) and $\dot{\gamma}$ the shear rate (s^{-1}). Dynamic viscosity curves were obtained with the following program: from 0.1 to 1000 s^{-1} with 5 points measured per decade (Log). Zero-shear viscosity (η_0) and shear rate at which viscosity is reduced to $\eta_0/2$ ($\dot{\gamma}_{1/2}$) are obtained from the equation of Morris [16]: $\eta = \eta_0 / [1 + (\dot{\gamma}/\dot{\gamma}_{1/2})]^{0.76}$ (Eq. 6). Oscillatory tests were performed at 25 °C using the same equipment. Variations in G' (storage modulus – elastic component), G'' (loss modulus – viscous component) and η^* (complex viscosity) were recorded as a function of frequency, thus obtaining the characteristic mechanical spectra. Frequency sweeps from 0.1 to 30 Hz were performed at constant strain within the linear viscoelastic range ($\gamma = 0.5\%$). All the measurements were performed at least in duplicate. Brookfield silicone oils respectively 9.2, 95.5 and 4950 cp were used as newtonian behavior references. Hyperentanglement highlighting was characterized by preparing solutions of galactomannans in alkali (1 M NaOH) and comparing their viscosity before and after neutralization with HCl. Experimentally, the volume changes during neutralization were measured, and the polysaccharide concentration in the alkali solution was adjusted to the same value by addition of the appropriate volume of 1M NaOH. Comparison was also made with the same concentration of galactomannan dissolved directly in 1 M NaCl.

3.2.3. Analysis of hydrogels with the texture analyzer

Dilute solutions (0.05 – 2 g/100 mL) of LBG were prepared by mixing the appropriate amount of GM25 and GM80 fractions in distilled water at 90 °C, under mechanical stirring for 3 h and cooled to room temperature before three freeze-thaw cycles (-20 °C, 24 hours). If present, the excess water released during the operation was removed before measurements at 25 °C. A sample with a height of 10mm was placed in a cylindrical vessel in stainless steel (40 mm inner diameter). Gelled samples were prepared by wire-cutting standard-sized cylinder shape (fitted to the vessel) while viscous samples and water were simply poured into the vessel to the desired height. Samples were analyzed with a TA-XT2 texture analyzer (Stable Micro-Systems, Haslemere, UK). Instrumental texture profile analysis (TPA) methodology consists of compressing the gel sample twice in a reciprocal motion. TPA was performed by means of a 15 mm diameter flat circular probe, penetrating twice for 5 s into the gel at a speed of 60 mm/min (penetration depth = 5 mm). “Hardness is defined as the peak force during the first compression cycle; cohesiveness is defined as the ratio of positive force area during the second compression portion to that during the first compression; and springiness is defined as the height that the sample recovered during the time elapsed between the end of the first bite and the start of the second bite” [17]. All were averaged using 3 replicate determinations.

4. Results & discussions

4.1. Structural characterization

The fractionation process generated two pure galactomannans fractions (> 99.9%) with different chemical structures, for which a schematized representation is proposed in Fig. 1. The GM25 fraction consisted of galactomannans composed of shorter chains, richer in galactosyl, which were distributed at 70% inside “block” structures (grouped in “hairy” regions). The GM80 fraction consisted of longer galactomannans less substituted in galactosyls, although these were concentrated to 83% as substituted blocks (also grouped in “hairy” regions). The structural

characterizations of GM25 and GM80 fractions have been already discussed in detail in our previous study [4].

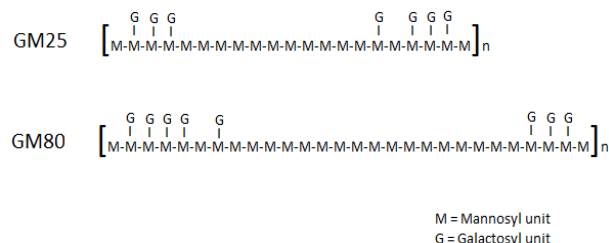


Figure 1. Schematic representation of GM25 and GM80 fractions structures. M and G are respectively mannosyl and galactosyl units. According to [4], with permission from Elsevier.

4.2. Behavior in dilute solution

Freed from the proteins present in the starting crude LBG [4], the galactomannans viscosity of GM25 and GM80 fractions were studied. A linear plot was obtained according to the Huggins equation (Eq. 3, Fig. 2) for solutions with relative viscosities (η_r) up to about 2. Extrapolation of reduced viscosity (η_{sp}/C) to zero concentration gave intrinsic viscosities of both LBG fractions: $[\eta]_{\text{GM25}} = 9.96 \text{ dL g}^{-1}$ and $[\eta]_{\text{GM80}} = 4.04 \text{ dL g}^{-1}$.

The Kraemer plot was also carried out on a range of points for which the specific viscosity (η_{sp}) was much less than 1. The intrinsic viscosity values obtained by the Kraemer equation (Eq. 4) were $[\eta]_{\text{GM25}} = 10.3 \text{ dL g}^{-1}$ and $[\eta]_{\text{GM80}} = 5.20 \text{ dL g}^{-1}$. Both values were close to those obtained by Huggins equation (Eq. 3). The adjustment of the linear regression of Kraemer plot however was not as good, due to the characteristics of these kinds of polymers. Indeed, such differences in graphical plotting for Kraemer and Huggins' extrapolations could be explained by the tendency for these compounds to aggregate with increasing concentration [18].

Huggins' values were lower than these of crude LBG found in the literature, generally between 11 and 16 dL g^{-1} [19, 20, 21, 22] but these crude samples also

contained proteins. Other authors presented similar results to ours, on cold and hot temperature extracts of carob gum (using ethanol extraction of locust bean flour with (i) an aqueous extraction of 30 min at 25 °C (CWS) followed by a centrifugation and (ii) a re-extraction at 90 °C for 30 minutes of the centrifugation pellet previously obtained at (HWS), also punctuated with a centrifugation step) [18]. They obtained $[\eta]_{\text{CWS}}$ and $[\eta]_{\text{HWS}}$ values respectively of 8.9 dL g⁻¹ and 6 dL g⁻¹, also with the value for the hot extract lower than $[\eta]$ of the cold extract. The $[\eta]_{\text{GM25}}$ value is close to what was observed by Doyle et al., [6] for other galactomannans possessing a DS_{gal} closer to that of GM25 fraction, such as fenugreek gum ($[\eta]=12.8$ dL g⁻¹, in water). Giannouli et al., [20] already showed that a decrease in the M/G ratio leads to an increase of the $[\eta]$ for the guar gum but this effect could be caused by some loss of galactose sidechains during partial hydrolysis of native guar gum to produce grades of lower viscosity.

In our case, low $[\eta]_{\text{GM80}}$ values may be attributed to decreased solute-solvent interactions. This can be confirmed by the determination of Huggins' constant. λ_{H} is a measure of polymer/polymer interaction in dilute conditions and depends upon the extent of coil expansion of the polymer coil [7]. It reflects how the viscosity of the system increases with the increase of polymer concentration, due to interaction of neighboring chains [23]. λ_{H} increases as the "solvent quality decreases resulting in polymer coil contraction. Larger values possibly indicate a poorer solvent and/or polymer aggregation" [7]. $\lambda_{\text{H}[\text{GM25}]}$ and $\lambda_{\text{H}[\text{GM80}]}$ were equal to 1.53 and 16.67 respectively. These values are higher than others reported (1.3 and 1.0) for crude LBG [18, 21] or other galactomannans (0.66) relatively structurally close [24] but show the same trend than a fractionated LBG, for which cold and hot extracts' λ_{H} are 0.8 and 5.1 respectively [18]. These differences in the values for LBG thus appear to be strongly related to the fractionation and/or purification process. During those processes, fractions more specific with a narrow structural distribution are selected [1], generating therefore different solvent/polymer or polymer/polymer interactions. The high values obtained for the Huggins' coefficient highlights a tendency for association of LBG galactomannans (i.e. a poorer solubility) mainly for the GM80 extract. The lower interaction coefficient of GM25 is an indication of less intermolecular interactions in GM25 solutions. Solute/solvent interactions are greater than for GM80 but solute-solute interactions are weaker. Consequently GM25 is more soluble in water while GM80 seems to tend to self-association likely due to longer chain lengths, as previously determined. It also appears that the galactosyl distribution in GM80 induces the presence of more hydrophobic areas [4]. These structures thus favor solutions with a poor degree of dispersion containing a higher proportion of very compact aggregates which make a small

contribution to the intrinsic viscosity. The intrinsic viscosity refers to the hydrodynamic volumes of the solute molecules and depends on their molecular weight [25].

The Mark-Houwink equation $[\eta] = KM^\alpha$ (Eq. 7) was used to determine molecular weights of GM25 and GM80. K and α parameters were determined by several authors. Robinson et al. (1982) thus reported $K = 0.00038$ and $\alpha = 0.723$ for galactomannans, while Picout et al., [26] obtained values of $K = 0.000296$ and $\alpha = 0.77$ for LBG. This rather simplistic model – involving only the M_w – was improved by other authors by including other structural characteristic such as DS_{Gal} [27, 28, 29]. It has also been adapted to include the specific volume [30] or the hydrodynamic volume occupied per mass unit. In this latter model, the intrinsic viscosity $[\eta]$ of disordered polymers varies with coil dimensions according to the Flory-Fox equation: $[\eta] = \Phi_F R_g^3 / M$ (Eq. 8), where R_g is the radius of gyration and Φ_F is a constant equal to $2.86 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$ for random coils of linear chains [31]. These models were used to predict the expected M_w values of GM25 and GM80 fractions based on their intrinsic viscosity. The results were compared with M_w values measured by HPSEC-MALLS in our previous study [4].

Table 1 reports the values of M_w carried out by HPSEC-MALLS on the two fractions and the M_w values calculated using different models (from $[\eta]$ and X_{gal} values). Rather important differences arise between the measurements and predictions. Such differences have also been reported on the crude LBG by Richardson et al., [7], who noted that the constants of Robinson et al., [12] lead to an overestimated value for M_w of crude LBG single chains. It seems that predictive Mark-Houwink models for galactomannans are in fact highly dependent on the technique of determination of M_w used to obtain the parameters K and α as well as the galactomannan type, the conditions of purification and/or fractionation, the sample preparation, etc. This partly explains the major differences between predictions and measurements. These models seem well adapted for crude gums but work less well on the fractions extracted from a native gum. The trend is the reverse of predicted values ($GM80 > GM25$). Moreover, unlike the fraction GM25, forecasts of GM80 fractions are always underestimated.

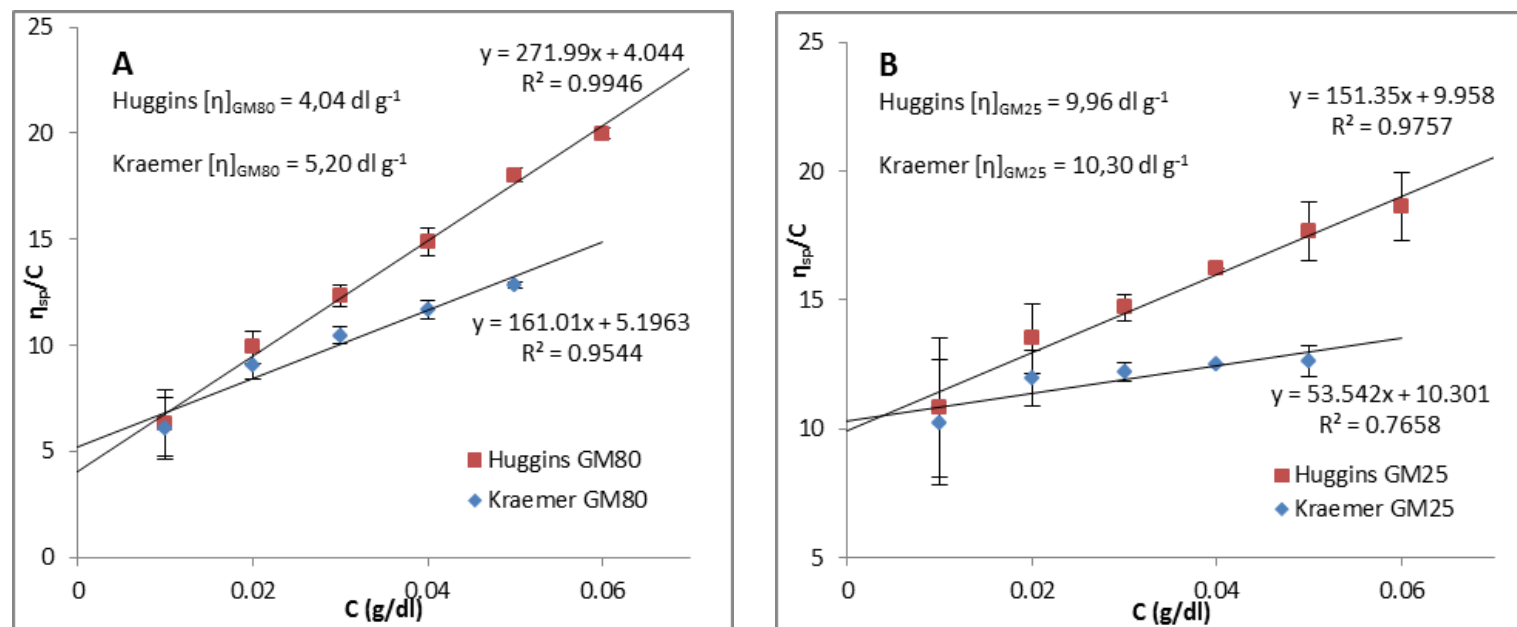


Figure 2. Huggins and Kraemer plots for GM25 and GM80 fractions in water.

Table 1. Values of GM25 and GM80 (i) based on measurements and (ii) calculated using different models proposed by other authors.

	Parameter	GM25	GM80	Type of result	Reference
Measurements	$[\eta]$ dl g ⁻¹	10.1	4.7	Huggins equation	Present work
	X _{gal}	0.26	0.21	GC-FID	[4]
	DP _w *	4698	5625	HP-SEC-MALLS	[4]
	PI	1.16	1.02	HP-SEC-MALLS	[4]
	$\langle Rg \rangle_w$ (nm)	91.7	106.9	HP-SEC-MALLS	[4]
	M _w (kDa)	761.1	911.3	HP-SEC-MALLS	[4]
Predicted	M _w (kDa)	1317.32	457.28	Mark Houwink model	[12]
	M _w (kDa)	769.64	284.99	Adapted Mark Houwink model	[26]
	M _w (kDa)	1561.76	667.59	Adapted Mark Houwink model	[27]
	M _w (kDa)	218.35	743.36	Floxy-Fox model	[31]

The models seem not suitable for poorly soluble polymers. This means that in the case of fractionated extractions DS_{Gal} and M_w are probably not the only parameters to be taken into account.

The distribution of side galactosyls is also suspected to play an important role on the properties and conformation of galactomannans [4]. This structural feature influences R_g . It is therefore considered in the model of Flory-Fox (Eq. 8) - not in the others - and the same trend is observed in M_w measured and determined by models, although the value for GM25 was very different. Thus, the determination of galactomannan's M_w with the Mark-Houwink equation (Eq. 7) from $[\eta]$ seems risky [21, 22, 32]. In any case, it is preferable to favor a direct measurement of M_w , especially if the results are subjected to further discussions.

In a range of different disordered polysaccharides, it has been shown that $c^* \approx 4/[\eta]$, when specific viscosities $\eta_{sp} \approx 10$. η_{sp} varies as $c^{1.4}$ for dilute solution and $c^{3.3}$ for semi-dilute concentrations [12, 33]. These commonly accepted values, however, may be different from other authors' reports. Thus guar gum and LBG show a transition at lower space occupancy ($C[\eta] \approx 1.3$) and the subsequent slope was substantially steeper for semi-dilute solutions [27]. This phenomenon could be explained by the presence of more specific interactions between the molecules, in addition to non-specific physical recoveries also found for non-branched polymers. These interactions are called hyperentanglement [11] and are directly related to the fine chemical structure of galactomannans, suggesting that hyperentanglements are attributed to unsubstituted mannan sequences in the galactomannan chains [4].

From our data in Fig. 3, it is not possible to determine C^* and C^{**} . Considering the slope change as corresponding to C^* , the coil overlap parameter $C[\eta]$ was determined for both fractions with $C[\eta]_{GM80}$ and $C[\eta]_{GM25}$ respectively equal to 0.931 and 1.365 for polymer concentrations respectively of 0.14% and 0.20%.

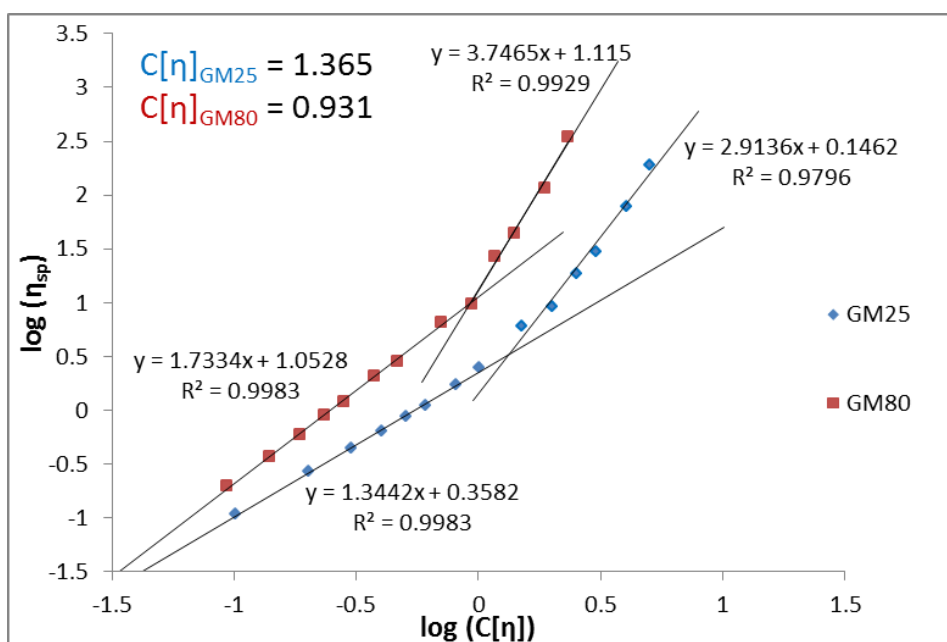


Figure 3. Determination of the coil overlap parameter for both GM fractions. Standard deviations are too small to be observable on the graph.

This means that the occupancy volume of the GM25 polymers is more important. This also indicates that the GM80 chains overlap faster than GM25, although their intrinsic viscosity was lower at first (see above). The figure also indicates that η_{sp} varied depending on $(\propto) c^{1.3}$ and $c^{1.7}$ in dilute regime, for GM80 and GM25 respectively. In semi dilute regime, the tendency is the same and $\eta_{spGM80} \propto c^{3.7}$ while $\eta_{spGM25} \propto c^{2.9}$. The greater slope for GM80 fraction can be attributed to the occurrence of more polymer-polymer interactions than for GM25, again probably due to its chemical structure. Although the coil-overlap parameter is away from usually accepted values for galactomannans [33, 12] – it is in fact the case in many studies on the subject – slope values in dilute and semi-dilute regime are close to those found by other authors for LBG (Table 2). Our results may thus be compared to those reported in literature for different galactomannans or fractions of galactomannans (Table 2). When $C[\eta]$, $[\eta]$ or slopes in both regimes are plotted as a function of the M/G ratio or M_w , no correlation appears between the data. In some of the previous studies, commonly accepted values are used but not measured experimentally. Even when these last values are removed from data, no correlation

appears. However, some authors have observed that a trend appears when one of these three previous parameters is plotted as a function of M/G ratio or M_w [27, 34]. It appears only for galactomannans from a specific origin and for a limited number of measurements. This suggests again that purification conditions, sample preparation and the method of measuring M_w and the M/G ratio are very important. It seems also that M_w and DS_{gal} are not sufficient to explain the behavior of galactomannans in dilute regime. The distribution of side galactosyls seems to be an essential parameter here, as suggested by Rinaudo [35].

Thus, in dilute solutions, a higher $[\eta]$ value is generated by the GM25 fraction with more soluble galactomannans at working temperature. This kind of polymer has a larger volume occupancy and will directly increase the viscosity of a solution. Conversely, the GM80 fraction has a lower $[\eta]$ because these galactomannans are poorly soluble at room temperature and have a tendency for self-association. When the concentration increases, the less soluble galactomannans of GM80 fraction overlap faster and rapidly form hyperentanglements. Above C^* a stronger network is generated resulting in a higher apparent viscosity in semi-dilute regime. A more complete characterization of semi-dilute solutions could be obtained through rheological studies.

Table 2. Values of M_w , M/G , $[\eta]$, $C[\eta]$ and α for galactomannans found in literature.

Polymer	Reference	M_w (MDa)	Ratio M/G	$[\eta]$ (huggins)	$C[\eta]$ at C^*	α at $C < C^*$	α at $C > C^*$
disordered polysaccharides	[33]	/	/	/	4.0	1.4	3.3
Guar gum	[12]	/	/	/	4	1.3	5.1
Guar gum 1	[27]	0.38	2*	2.3	1.3	1.2	3.5
Guar gum 2	[27]	0.52	2*	2.9	1.3	1.2	3.5
Guar gum 3	[27]	0.69	2*	3.6	1.3	1.2	3.5
Guar gum 4	[27]	0.68	2*	3.8	1.3	1.2	3.5
Guar gum 5	[27]	1.2	2*	6.8	1.3	1.2	3.5
Guar gum 6	[27]	1.7	2*	10	1.3	1.2	3.5
Guar gum 7	[27]	2.02	2*	11.7	1.3	1.2	4
Locust bean gum 1	[27]	1.1	4*	7.7	1.3	1.3	3.8
Locust bean gum 2	[27]	1.33	4*	9.3	1.3	1.3	3.8
Locust bean gum 3	[27]	1.45	4*	10.1	1.3	1.3	3.8
Locust bean gum 4	[27]	1.6	4*	11.2	1.3	1.3	3.8
Locust bean gum 5	[27]	1.38	4*	10.0	1.3	1.3	3.8
<i>Mimosa scabrella</i>	[46]	/	1.1	/	2.6	1	4.2
Mesquite seed gum	[25]	/	4*	2.4	2.7	2.2	5.3

Polymer	Reference	Mw (MDa)	Ratio M/G	$[\eta]$ (huggins)	$C[\eta]$ at C^*	α at $C < C^*$	α at $C > C^*$
Fenugreek	[6]	/	1*	16.0	2.8	1.4	4.2
Locust bean gum	[7]	0.37	3.9	13.8	1.4	1.2	2.3
Guar gum	[7]	0.81	1.7	9.3	0.9	1.3	2.4
Guar gum	[29]	/	1.6	14.2	1.7	1.2	4.7
S <i>egyptica</i>	[29]	2.8	1.3	11.6	6.5	1.4	5.5
S <i>grandiflora</i>	[29]	2.3	1.6	8.6	3	1.5	5.1
Guar 1	[34]	2.2	/	17.2*	1.8	/	4.6
Guar 2	[34]	1.5	/	10.6*	1.9	/	4.5
Guar 3	[34]	0.3	/	4.4*	2.3	/	4
Locust bean gum	[32]	2.0*	3.3	13.5	3.3	1.2	4.8
Caesalpinia <i>pulcherina</i>	[32]	2.1*	2.8	13.5	3.3	1.2	4.8
Cassia <i>javanica</i>	[32]	1.9*	3.2	12.9	3.3	1.2	4.8
GM25 (LBG)	This work	0.76	2.85	10.1	1.3	1.3	2.9
GM80 (LBG)	This work	0.91	3.84	4.7	0.8	1.7	3.7

* Not measured. Commonly accepted values used in the work or values obtained from Eq. 7.

4.3. Behavior in unperturbed state

As demonstrated above (Fig. 3), the C^* is reached for GM25 and GM80 fractions at contents of 0.14% and 0.20%, respectively. This means that entanglements appear beyond these concentrations. Such solutions can be studied with a rheometer. Fig 4 presents steady shear viscosity profiles of GM25 (blue) and GM80 (red) fractions at 0.5%, 1% and 2%. These graphs demonstrate the relationship between apparent viscosity η (Pa.s) and shear rates $\dot{\gamma}$ (s^{-1}). Both fractions studied showed a shear thinning behavior for each concentration. This means that the apparent viscosity decreased as the shear rate increased. Under imposed shear stress, macromolecules are disentangled more or less quickly – depending on entanglements density and the strength of interactions – to end up oriented in the direction of the flow. This reorganization of macromolecules results in a decrease of viscosity, which is more pronounced when the concentration of the solutions increases.

The apparent viscosity η on the range of shear rates tested ($\dot{\gamma}$) was greater for the fraction GM80 than GM25 at each concentration studied. η_0 and $\dot{\gamma}_{1/2}$ values, obtained from Eq. 6 are provide in Table 3. For both fractions, η_0 increased with the concentration. The increase of η_0 was also more pronounced for the GM80 fraction which reached a very high value at 2% ($\eta_{0(GM80)} = 832$ Pa.s ; $\eta_{0(GM25)} = 45.13$ Pa.s). However $\eta_{0(GM80)}$ at 2% had to be obtained graphically from Fig 4. Indeed, Morris equation did not fit with the flow curve of GM80 2% and generated an underestimated value of η_0 (172 Pa.s). $\dot{\gamma}_{1/2}$ gives a good appreciation of the shear thinning effect. Thus, for both fractions, the shear-thinning effect increased with concentration. $\dot{\gamma}_{1/2(GM25)}$ showed a decrease from 93.0 to 2.2 for solutions of GM25 at 0.5% and 2%, respectively. This effect was however more marked for the GM80 fraction whose $\dot{\gamma}_{1/2}$ decreased from 68.6 (0.5%) to 0.3 (2%). Thus, the shear thinning effect seemed always stronger for the GM80 fraction than the GM25, for a given concentration.

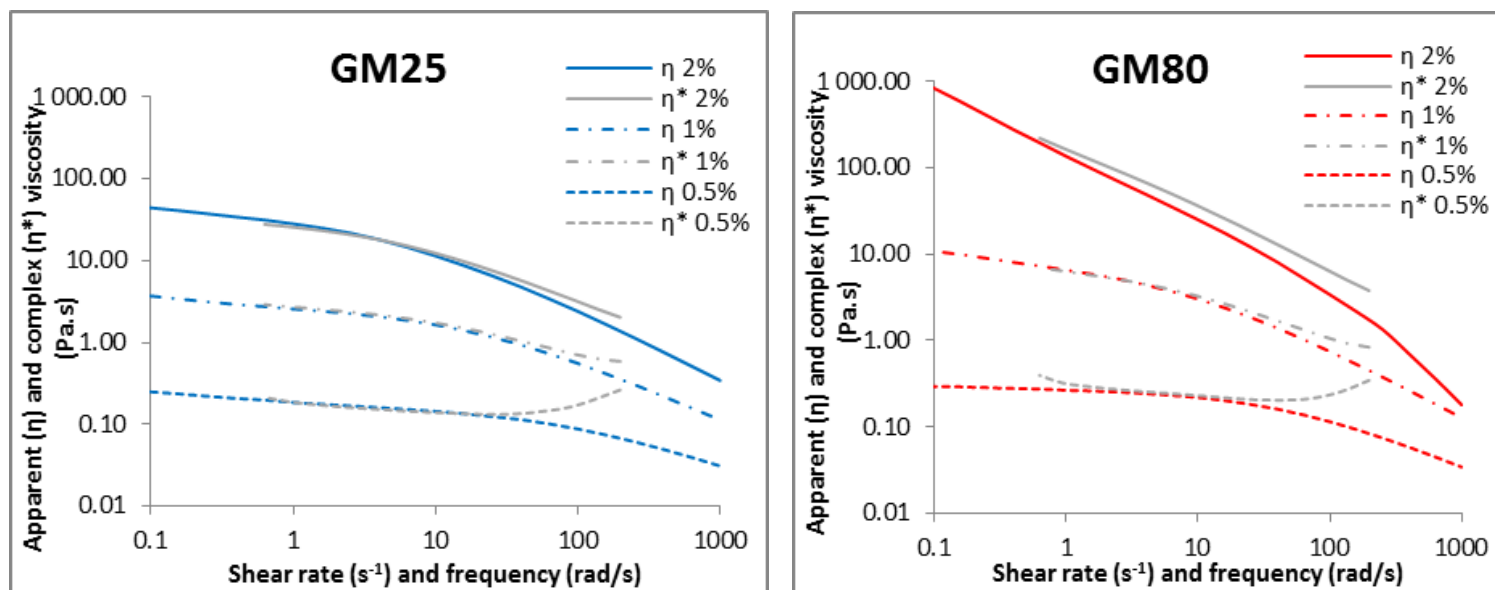


Figure 4. Steady shear viscosity profile of GM25 (left) and GM80 (right) fractions at 0.5%, 1% and 2%.

Analysis of Table 3 indicates that the increasing concentration resulted in an increase in the overall viscosity as well as an increase in shear-thinning behavior, as generally observed for polymers. To reveal any departures from the general form of shear thinning reported for random coil polysaccharides, applied shear rates have been expressed as a fraction of $\gamma_{1/2}$ ($\gamma/\gamma_{1/2}$) and plotted with viscosities expressed as a fraction of η_0 (η/η_0) [16].

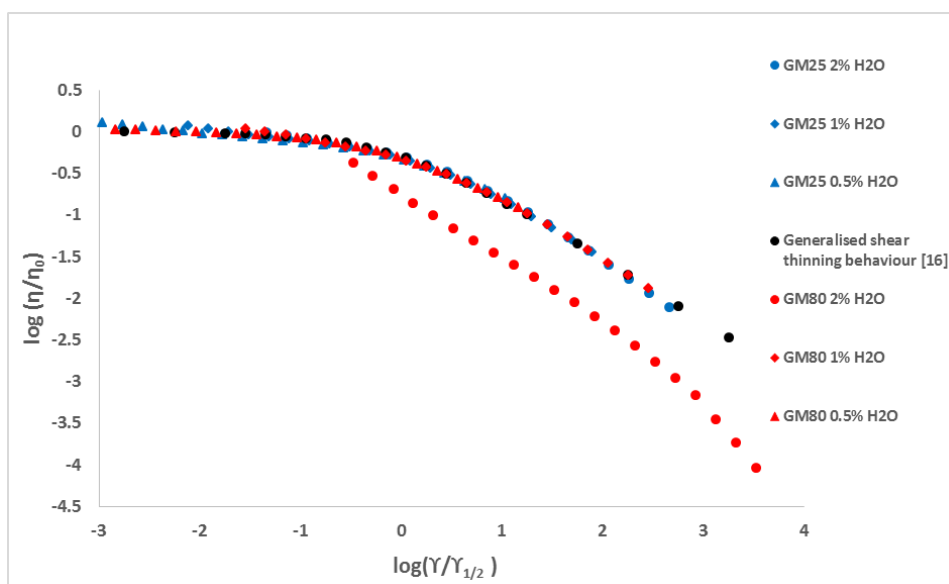


Figure 5. Generalized shear-thinning curve for random coil polysaccharides (black spots) and comparisons to GM25 and GM80 fractions.

Fig. 5 indicates that, except for GM80 2% curve that was drawn using the η_0 obtained graphically from Fig 4, individual flow curves for both fractions converge to a single master curve – irrespective of primary structure, molecular weight and concentration – that correspond to the general form of shear thinning reported for random coil polysaccharides [33]. GM80 fraction at 2% was a different case since it is a gel and not a solution anymore as shown in Fig 7 (Eq. 6 are applicable only for solutions). Other phenomena govern the interactions between polymers in gel state.

Table 3. Zero-shear viscosity (η_0) and shear rate at which viscosity is reduced to $\eta_0/2$ ($\gamma_{1/2}$) for GM25 and GM80 fraction at different concentrations in pure water at 25 °C.

Sample in water	η_0 (Pa.s)	$\gamma_{1/2}$ (s ⁻¹)
GM25 0.5%	0.02	93.0
GM25 1%	3.14	12.9
GM25 2%	45.13	2.2
GM80 0.5%	0.28	68.6
GM80 1%	9.87	3.5
GM80 2%	832*	0.3

*obtained graphically from Fig 4

From steady shear profiles analyses it appears that GM80 fraction has a structure able to generate a higher viscosity in water, but paradoxically more easily able to disrupt entanglements and more easily orientable in the direction of flow (more shear-thinning). This difference in behavior between both fractions with similar structures could be explained by a greater number of hyperentanglements when the concentration in GM80 galactomannans increases. This results in the appearance of a network with many junction areas able to orient themselves in the flow direction when the shear rate increases.

As previously reported, the concept of hyperentanglement can also be probed by comparison of solution properties in strong alkali and at neutral pH at the same overall ionic strength [7, 36]. Indeed, at high pH, hydroxyls groups become ionized and destabilize intermolecular associations by introducing electrostatic repulsions between the constituent chains of solutions over C**. Fig 6 shows steady shear viscosity profiles for GM25 and GM80 fractions at 1% in different media, with the same ion concentration. “NaOH” refers to a solution prepared in caustic soda, “Neut” to the soda solution neutralized with HCl, and “NaCl” to a saline solution with the same ionic strength. The steady shear viscosity profiles of 1% galactomannan solutions in aqueous NaCl are different from those for the same measurements in water ($\eta_{0(GM25/NaCl)} = 1.9$ Pa.s ; $\gamma_{1/2(GM25/NaCl)} = 23.4$ s⁻¹ ; $\eta_{0(GM80/NaCl)} = 19.7$ Pa.s, $\gamma_{1/2(GM80/NaCl)} = 0.7$ s⁻¹).

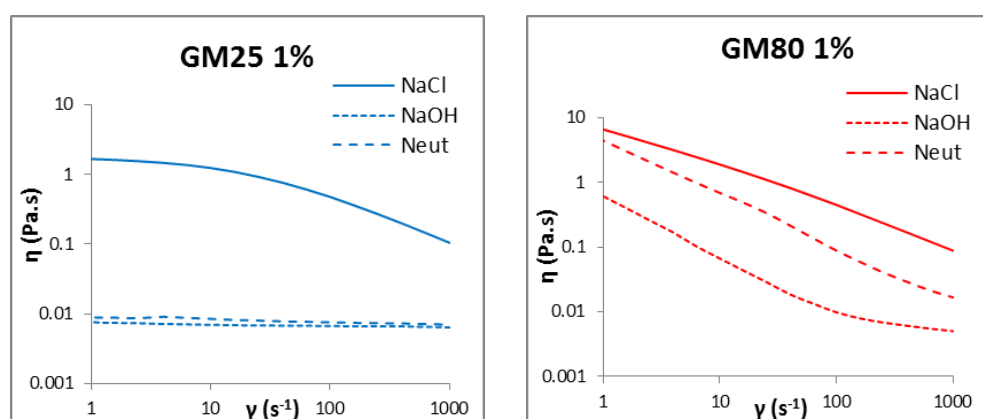


Figure 6. Steady shear viscosity profile of GM25 (left) and GM80 (right) fraction at 1% in alkaline medium, neutralized medium and salt water (25 °C).

These differences could be explained by the involvement of Na^+ and Cl^- in the network structure or by a slight difference in the concentration during solutions preparation (see below). "Neut" and "NaCl" curves contain exactly the same amount of polysaccharides (1%) and NaCl. The obvious non-overlapping of the curves indicates that polysaccharides were partially degraded during the preparation of the "Neut" solution (3 h, 1 M NaOH, 90 °C before neutralization with HCl). It has been reported previously that polysaccharides are susceptible to degradation under alkaline conditions, by a 'peeling' reaction initiated at the reducing end of the chain [37]. This seems to be the case for the two fractions studied although the impact of the degradation is less marked for GM80 fraction (perhaps due to a greater M_w). When the curves "NaOH" and "Neut" are compared with each other, major differences are observed between the two fractions. The fraction GM25 shows no significant differences between the two curves. The alkaline environment does not modify the rheology of this fraction. The GM80 fraction shows an increase in the viscosity when the solution is neutralized (curve "Neut"). This means that the alkaline medium prevents the formation of a stronger GM80 network. The rheological behavior of GM25 fraction – more substituted and with fewer smooth areas – seems essentially due to the length of the main chains and their physical recoveries. In contrast, the GM80 fraction – less substituted and with a higher number of smooth areas – shows a rheological behavior mainly influenced by alkali-labile non-covalent associations (hyperentanglements) that give rise to departure from the general behavior of concentration-dependence for disordered polysaccharides. The study of viscoelastic properties is one of the main techniques

to highlight entanglements. The mechanical spectra of GM25 and GM80 fraction dispersions – at 0.5%, 1% and 2% in water as well as in aqueous NaCl (1 M) – are shown in Fig 7.

Except for GM80 at 2%, graphs for dispersion in water are typical of galactomannans in semi-dilute conditions that are viscoelastic fluids generating an entangled network. The loss modulus G'' (Pa), related to the viscous component and giving the energy dissipated per cycle of deformation per unit, is greater at low oscillation frequencies than the storage modulus G' (Pa), related to the elastic component. The reverse is observed at higher frequencies. Beyond the crossover frequency (shift point), the oscillation frequency becomes too high and galactomannans chains cannot be dissociated. The interaction between the G' and G'' curves was shifted at lower frequencies for the GM80 fraction. This means that the beginning of the elastic zone ($G' > G''$) was shifted towards lower frequencies with increasing average molecular weight, M/G ratio and number of smooth areas. GM80 fractions quickly had an elastic dominance behavior generated by entanglements and hyperentanglements which dissociate less easily. For these entangled networks, the GM80 fraction has a much stronger viscoelastic behavior and greater dynamic (complex) viscosity η^* than the GM25 fraction (Fig. 4) whose G' and G'' are lower. The case of GM80 at 2% in water is different. The G' and G'' curves have a profile of weak gel on which no crossover is observed [38]. The elastic component G' is greater than the viscous component G'' over the entire frequency range. At this concentration, the fibers of galactomannans GM80 are thus able to “freeze” the medium by aggregation of macromolecules. They generate a three-dimensional network with a semi-solid behavior in which the solvent is trapped and cannot move freely. A 2% content (w/v) of GM80 in pure water, heated until 90 °C, enables to reach the point of gelation. Under the same conditions, GM25 fraction does not turn into a gel, highlighting again the structural differences between the two fractions. As shown in the flow curves (Fig 6 and 7), the presence of salt in the medium can also impact the behavior, changing the mechanical spectra. The GM25 fractions in aqueous 1 M NaCl (irrespective of % w/v) exhibits viscoelastic-fluid curves almost identical to those obtained in water, with crossover frequencies similar in both media, except for GM25 fraction at 2% that slightly shifted towards lower frequencies in H₂O.

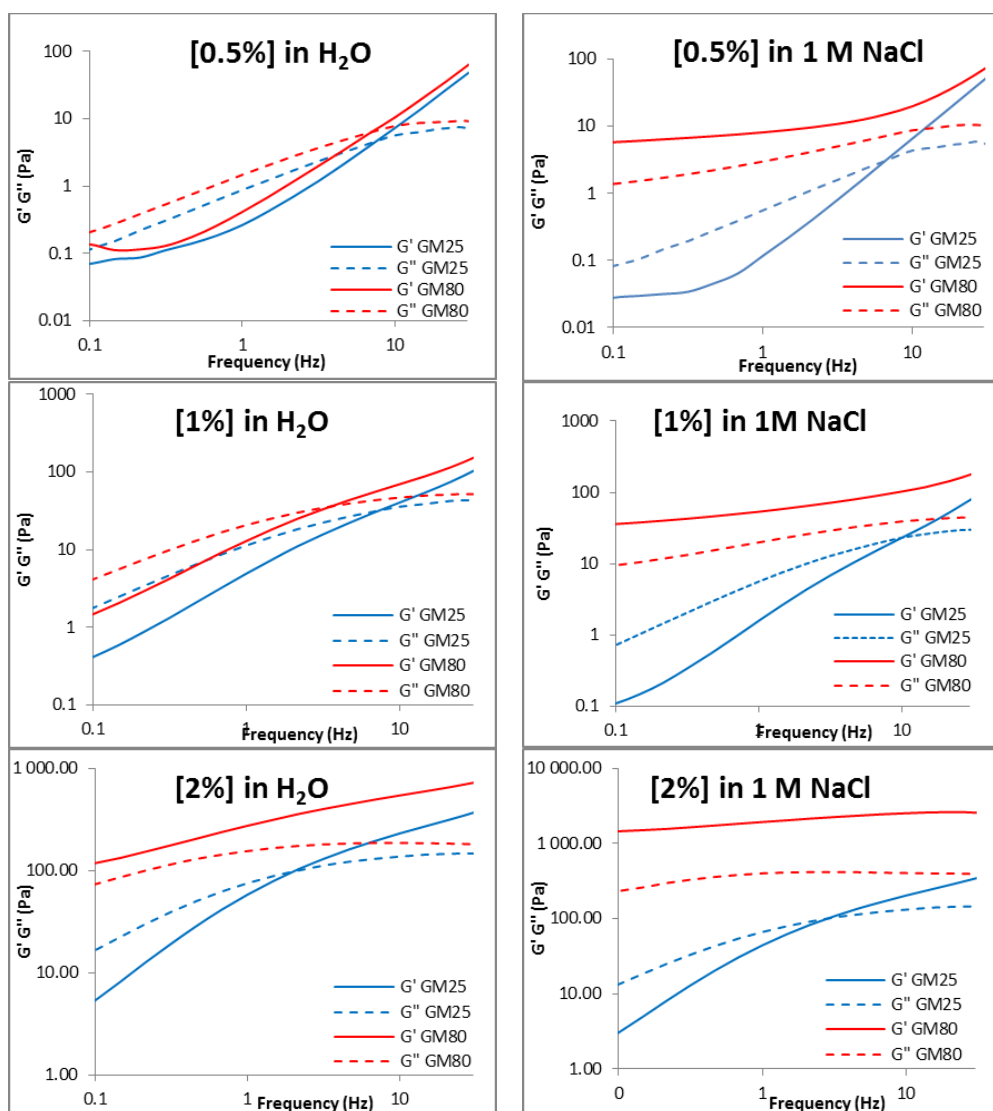


Figure 7. Mechanical spectra of GM25 and GM80 fraction at different galactomannan contents in pure water (left) and salt water (right).

The saline environment seems to have a greater influence on GM80 fractions behavior. Indeed, GM80 fraction acts as a weak gel in all cases, even for lower concentrations in galactomannan (0.5%). The GM80 fraction at 1% provided the same flat spectrum as a solution of 1% xanthan, which is considered a weak gel [39]. The GM80 mechanical spectra in aqueous NaCl (1 M) have G' and G'' curves greater by approximately a factor 10 than the same curves obtained in water. The Na^+ and Cl^- ions seem interact with the polymers to “freeze” the medium and make macromolecular interactions stronger. Lyotropic effects were studied on konjac glucomannan [40] and an increase in both moduli (G' and G'') and viscosity upon addition of salting-out salts was evidenced. According to the authors, this is due to the enhancement of the salt-induced water structure perturbations or the strong interactions between ions and specific sites on the polymers. The experimental data do not permit to discuss any potential lyotropic effect here, since potential lyotropic effects of NaCl would be investigated with lyotropic series cations and anions on one GM concentration. However, NaCl is considered a relatively weak salting-out salt.

Thus, we can conclude that differences in behavior between GM25 and GM80 are simply accentuated in the presence of salt, but also with the increase in polymer concentration. Sittikijyothin et al. [11] showed mechanical spectra of CLBG in water, for which the behavior was not those of a perfect viscoelastic fluid but trended to a weak gel. The cross point of a 1% solution was located around 60 Hz (below 10 Hz in our case). Such differences could be explained by the fact that the measurements were performed on CLBG (still containing some proteins), without excluding that sodium azide present in the medium as a preservative could also have an influence on the galactomannans rheology. The relationship between apparent viscosity (η) and complex viscosity (η^*) can also be studied as shown in Fig. 4. Superimposability of the two viscosities – known as the Cox-Merz rule [41] is satisfied for the random coil polysaccharides in which the rheological behavior is controlled by simple physical entanglements (recovery). A difference in behavior occurred between both fractions at 2% solutions. These phenomena are more pronounced for the GM80 fraction for which the η^* curve has a greater deviation than GM25. These observations suggests that the same types of molecular rearrangements are not occurring in both flow patterns, over the frequency range employed, i.e. a short range interaction mechanism may influence the small deformation measurement but be effectively destroyed in shear flow [42, 43]. These rearrangements can be attributed to more specific associations of molecules for a larger time scale or to hyperentanglements rather than non-specific physical entanglements [33]. At 1% and 0.5%, η^* curves are similar and are superimposable

to η curves, except for higher frequencies where they gradually diverge. Upturns in moduli and hence in η^* , at high frequencies are often seen in mechanical spectra on less concentrated solutions. They are usually attributed to the onset of resonance in the measuring geometry and were also observed on newtonian silicone oils with similar viscosity and used as references.

4.4. Behavior in gel state

To produce solid state, the galactomannan concentration may be increased to reach gel formation, but experimentally the homogeneity of the medium is difficult to maintain. Another way is to contract viscous solutions by three freeze-thaw cycles [14]. The excess water released during the operation increases the medium concentration and generates the gel state. This operation was performed on several previously studied solutions. After three freeze-thaw cycles, solutions under 0.5% of initial content showed visually no differences from the initial viscous solutions. Above an initial content of 0.5%, galactomannans formed a jellified pellet, more compact when the concentration increased. Three main textural parameters (hardness, cohesiveness and springiness) were extracted from the force-time curves. Results are provided in Table 4.

The hardness analysis confirmed that a threshold concentration in galactomannan had to be achieved before reaching jellification. Below 0.5% of initial galactomannan content, the hardness showed no significant difference compared with pure water. The hydrogels were formed after freeze-thaw when the initial content in the medium reached about 0.5%. The above results imply that an interpenetration of the polymer chains is required to form such gels. Hydrogels obtained from GM80 also had a much higher hardness, suggesting again the important role of the polymer structure in the formation of the gel state. Springiness was not detectable below 0.5% too. Above this concentration, GM80 fractions reached values of about 0.7 with no significant differences, while the 2% GM25 fraction showed the highest value (0.83). This means that 2% GM25 hydrogel was the most flexible and between the two compression cycles it regained a shape close to its original one. Cohesiveness is the work needed to break the internal structure of the product. This parameter makes sense only for real hydrogels. In the case of GM25, an increase in the cohesiveness was observed when the concentration increased.

Table 4. Main textural parameters obtained from TPA on different galactomannan dispersion/hydrogels.

Initial solution		0%	0.05%	0.10%	0.50%	1%	2%
Hardness (N)	GM25	0.02 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.11 ± 0.01
	GM80	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.20 ± 0.03	0.47 ± 0.13	0.51 ± 0.07
cohesiveness	GM25	/	/	/	0.47 ± 0.14	0.64 ± 0.16	0.69 ± 0.03
	GM80	/	/	/	0.73 ± 0.10	0.66 ± 0.03	0.66 ± 0.06
Springiness	GM25	/	/	/	0.58 ± 0.11	0.56 ± 0.05	0.83 ± 0.02
	GM80	/	/	/	0.73 ± 0.04	0.68 ± 0.09	0.72 ± 0.03

This implied that the most concentrated gels became stronger and less deformable. In the case of GM80, the cohesiveness at 0.5% of initial content was higher than for GM25 fraction but it did not increase thereafter. The gels obtained with GM80 at 2% are therefore stronger but more brittle than those obtained with GM25.

Different chemical structures therefore also lead to different gel state properties through junction areas probably formed between the smooth areas of the galactomannan chains, as previously suggested in some models [44, 45]. In our case, smooth areas are more important for GM80 fraction [4] and therefore may lead to numerous junction areas. These areas could be involved in the formation of harder and more solid gels, while a lower number of these suspected specific interactions (i.e. more "physical" entanglements) leads to the formation of softer gels (less brittle) such as those obtained with the fraction GM25. Such gels probably allow more mobility to the polymers involved in the gel network.

5. Conclusions and perspectives

This global study of viscosity demonstrates that small differences in structure within the same polymer generate different behaviors at different levels of observation (dilute solution, unperturbed state and gel state). This work also additionally highlighted that: (i) specific interactions (alkali labile non-covalent) exist between galactomannans chains – mainly for the fraction GM80 – while rheology of the GM25 fraction is more influenced by its molecular weight. According to the commonly accepted assumptions, these interactions would originate from a greater presence of non-substituted galactosyls areas on the main mannosyls chain. The regions supposedly more hydrophobic could attract themselves within the same chain in dilute regime leading to a folding which reduces the hydrodynamic volume of the polysaccharide, itself responsible for its intrinsic viscosity; (ii) the use of the Mark-Houwink equation is limited in this context; (iii) the viscoelastic behavior is modified in the presence of salt; (iv) very different gels structures are obtained according to the structure and the polymer concentrations.

In denser media, the same interactions might be the origin of hyperentanglements which form a stronger network in which each individual chain loses mobility. However at this stage, conventional tools of chemical characterization or viscosity studies did not allow the demonstration of the physical nature of such junction areas. Solid state NMR would be an interesting technique to highlight the differences in

mobility within the mannosyls population of galactomannan gels, which are the expected result from specific interactions between neighbor chains.

The fundamental study of the galactomannan viscosities coupled with their structure also allows to glimpse applications that would target polymeric structures for specific properties. Thus, a fraction such as GM25 is interesting because it imparts a viscosity at a low temperature to an aqueous medium, thus avoiding a costly and unnecessary heating in addition to a blending operation. This fraction also keeps its viscoelastic properties even in a formulation where salt content may be significant. Conversely, a fraction with low-substituted galactose as GM80 is able to give a much higher viscosity to a medium even in low concentration, which would therefore reduce the load as additive in a formulation.

Acknowledgements

Authors thank Mrs. V. Byttebier, O. Denies and I. Van de Vreken for technical assistance.

6. References

- [1] S. Gillet, C. Blecker, M. Paquot, A. Richel, Chemical structure – physical properties of galactomannans extracts from locust bean, *C. R. Chim.* 17(4) (2014) 386-401.
- [2] B. McCleary, Hydrolysis of galactomannans by α -D-galactosidase and α -D-mannanase. In J. John Marshall (Ed.), *Mechanisms of saccharide polymerization and depolymerization*, New York: Academic Press, 1980, pp. 285-300.
- [3] I. Dea, A. Morrison, Chemistry and interactions of seed galactomannans, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 31(1975) 241-312.
- [4] S. Gillet, C. Blecker, M. Aguedo, P. Laurent, M. Paquot, A. Richel, Impact of purification and process on the chemical structure and physical properties of locust bean gum, *Carbohydr. Polym.* 108 (2014) 159-168.
- [5] S. Gillet, M. Simon, M. Paquot, A. Richel, Review of the influence of extraction and purification process on the characteristics and properties of locust bean gum, *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 18(1) (2014) 97-107.
- [6] J. Doyle, G. Lyons, E. Morris, New proposals on “hyperentanglement” of galactomannans: solution viscosity of fenugreek gum under neutral and alkaline conditions, *Food Hydrocoll.* 23 (2009) 1501-1510.
- [7] P. Richardson, J. Wilmer, T. Foster, Dilute solution properties of guar and locust bean gum in sucrose solutions, *Food Hydrocoll.* 12 (1998) 339-348.
- [8] B. Launay, G. Cuvelier, S. Martinez-Reyes, Viscosity of locust bean, guar and xanthan gum solutions in the Newtonian domain: a critical examination of the $\log (\eta_{sp})_0 - \log C[\eta]_0$ master curves, *Carbohydr. Polym.* 34 (1997) 385-395.
- [9] P.G. de Gennes, Polymer solutions in good solvents. In *Scaling concepts in polymer physics*, New York: Cornell University Press 1979, pp. 69-97.
- [10] B. Tinland, G. Maret, M. Rinaudo, Reptation in semi-dilute solutions of wormlike polymers, *Macromolecules* 23(2) (1990), 596-602.
- [11] W. Sittikijyothin, D. Torres, M.P. Gonçalves, Modelling the rheological behavior of galactomannan aqueous solutions, *Carbohydr. Polym.* 59 (2005) 339-350.
- [12] G. Robinson, S. Ross-Murphy, E. Morris, *Carbohydr. Res.* 107 (1982), 17-32.
- [13] M. Vieira, A. Gill, A solid state NMR study of locust bean gum galactomannan and Konjac glucomannan gels, *Carbohydr. Polym.* 60 (2005) 439-448.

- [14] I. Dea, E. Morris, D. Rees, J. Welsh, H. Barnes, J. Price, Association of like and unlike polysaccharides: mechanism and specificity in galactomannans, interacting bacterial polysaccharides, and related systems, *Carbohydr. Res.* 57 (1977) 249-272.
- [15] R. Tanaka, T. Hatakeyama, H. Hatakeyama, Formation of locust bean gum hydrogels by freezeing-thawing, *Polym. Intern.* 45 (1998) 118-126.
- [16] E. R. Morris, Shear-thinning of “random coil” polysaccharides: Characterisation by two parameters from a simple linear plot, *Carbohydr. Polym.* 13 (1990) 85-96.
- [17] C. Blecker, M. Paquot, C. Deroanne, Gelling properties of whey proteins after enzymic fat hydrolysis, *J. Food Sci.* 65 (2000) 561-563.
- [18] S. Gaisford, S. Harding, J. Mitchell, T. Bradley, A comparison between the hot and cold water soluble fractions of two locust bean gum samples, *Carbohydr. Polym.* 6 (1986) 423-442.
- [19] E. Azero, C. Andrade, Testing procedure for galactomannan purification, *Polym. Test.* 21 (2000) 551-556.
- [20] J. Da Silva, M. Rao, Viscoelastic properties of food hydrocolloid dispersions. In: Rao, M. and Steffe, J. (Eds), *viscoelastic properties of foods*, London : Elsevier Applies Science Publishers 1992, pp. 285-315.
- [21] P. Giannouli, R. Richardson, E. Morris, Effect of polymeric cosolutes on calcium pectinate gelation. Part 1. Galactomannans in comparison with partially depolymerised starches, *Carbohydr. Polym.* 55 (2004) 343-355.
- [22] C. Mao, J. Chen, Interchain association of locust bean gum in sucrose solutions : An interpretation based on thixotropic behavior, *Food Hydrocoll.* 20 (2006) 730-739.
- [23] A. Elfak, G. Pass, G. Phillips, R. Morley, The viscosity of dilute solutions of guar gum and locust bean gum with and without added sugars, *J. Sci. Food Agric.* 28 (1977) 895-899.
- [24] R. Guo, L. Ai, N. Cao, J. Ma, Y. Wu, J. Wu, X. Sun, Physicochemical properties and structural characterization from *Sophora alopecuroides* L. seeds, *Carbohydr. Polym.* 140 (2016) 451-460.
- [25] B. Yoo, A. Figueiredo, A. Rao, Rheological properties of mesquite seed gum in steady and dynamic shear, *Lebensm.-Wis. u -Technol* 27 (1994) 151-157.
- [26] D. Picout, S. Ross-Murphy, K. Jumel, S. Harding, Pressure cell assisted solution characterization of polysaccharides. 2. locust bean gum and tara gum, *Biomacromolecules* 3 (2002) 761-767.

- [27] J. Doublier, B. Launay, Rheology of galactomannan solutions: comparative study of guar gum and locust bean gum, *J. Texture Stud.* 12 (1981) 151-172.
- [28] M. Pollard, B. Eder, P. Fisher, E. Windhab, Characterization of galactomannans isolated from legume endosperms of Caesalpinioideae and Faboideae subfamilies by multidetection aqueous SEC, *Carbohydr. Polym.* 79 (2010) 70-84.
- [29] M. Pollard, P. Fisher, E. Windhab, Characterization of galactomannans derived from legume endosperms of genus *Sesbania* (Faboideae), *Carbohydr. Polym.* 84 (2011) 550-559.
- [30] M. Renaud, M. Belgacem, M. Rinaudo, Rheological behaviour of polysaccharide aqueous solution, *Polym.* 46 (2005) 12348-12358.
- [31] A. Lederer, W. Burchard, A. Khalyavina, P. Linder, R. Schweins Is the universal law valid for branched polymers? *Angew. Chem. Int. Ed.* 52 (2013) 4659-4663.
- [32] C. Andrade, E. Azero, L. Luciano, M. Goncalves, Solutions properties of the galactomannans extracted from the seeds of *Caesalpinia pulcherrima* and *Cassia javanica*: Comparison with locust bean gum, *Intern. J. Biol. Macromol.* 26 (1999) 181-185.
- [33] E. Morris, A. Cutler, S. Ross-Murphy, D. Rees, Concentration and shear rate dependence of viscosity in random coil polysaccharide solutions, *Carbohydr. Polym.* 1 (1981) 5-21.
- [34] M. Pollard, P. Fischer, Semi-dilute galactomannan solutions: observations on viscosity scaling behavior of guar gum, *J. Phys.: Cond. Matter* 26 (2014) 464107.
- [35] M. Rinaudo, Relation between the molecular structure of some polysaccharides and original properties in sol and gel states, *Food Hydrocoll.* 15 (2001) 433-440.
- [36] F. Goycoolea, E. Morris, M. Gidley, Viscosity of galactomannans at alkaline and neutral pH: evidence of "hyperentanglement" in solution, *Carbohydr. Polym.* 27 (1995) 69-71.
- [37] G.O. Aspinall, *Polysaccharides*, Pergamon Press, Oxford 1970.
- [38] A. Clark, S. Ross-Murphy, Structural and mechanical properties of biopolymer gels. *Biopolymers. Advances in Polymer Science* 83, Springer Berlin, Heidelberg, 1987, pp. 57-192.
- [39] S. Ross-Murphy, Structure-property relationships in food biopolymer gels and solutions, *J. Rheol.* 39 (1995) 1451-1493.
- [40] Yin, W., Zhang, H., Huang, L., Nishinari, K., Effects of the lyotropic series salts on the gelation of konjac glucomannan in aqueous solutions, *Carbohydr. Polym.* 74(1) (2008) 68-78.

- [41] W. Cox, E. Merz, Correlation of dynamic and steady flow viscosities, *J. Polym. Sci.* 28(118) (1958) 619-622.
- [42] R. Richardson, S. Ross-Murphy, Non-linear viscoelasticity of polysaccharide solutions. 2: Xanthan polysaccharide solutions, *Intern. J. Biol. Macromol.* 9 (1987) 257-264.
- [43] R. Richardson, S. Ross-Murphy, Non-linear viscoelasticity of polysaccharide solutions. 1: guar galactomannan solutions, *Intern. J. Biol. Macromol.* 9 (1987) 250-256.
- [44] I. Dea, A. Clarck, B. McCleary, Effect of galactose-substitution-patterns on the interaction properties of galactomannans, *Carbohydr. Res.* 147 (1986) 275-294.
- [45] I. Dea, A. Clarck, B. McCleary, Effect of the molecular fine structure of galactomannans on their interaction properties – the role of unsubstituted sides, *Food Hydrocoll.* 1 (1986) 129-140.
- [46] J. Ganter, M. Milas, J. Corrêa, F. Reicher, M. Rinaudo, Study of solution properties of galactomannan from the seeds of *Mimosa scabrella*, *Carbohydr. Polym.* 17 (1992) 171-175.

Structure impact of two galactomannan fractions on their degradation kinetics in high temperature water

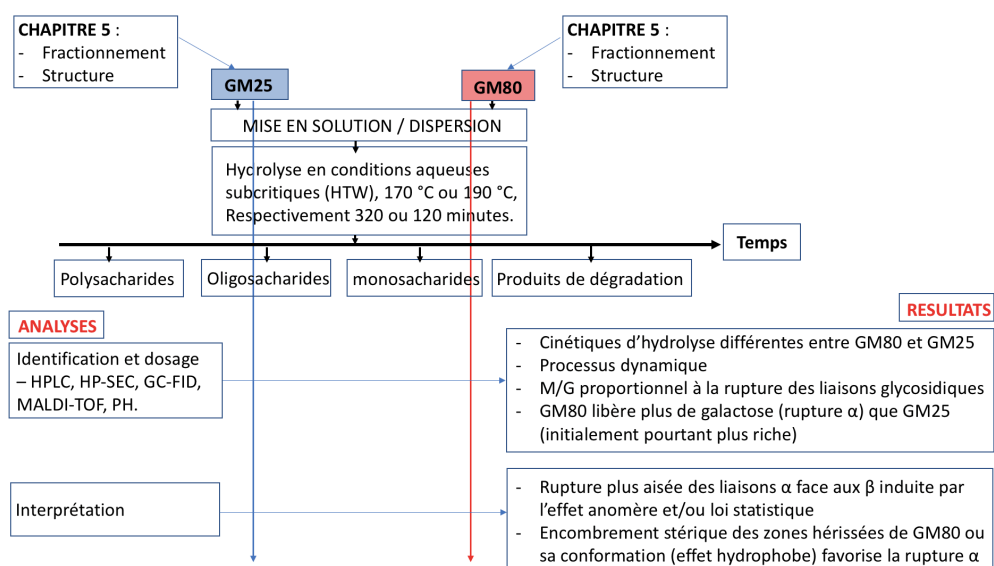
Gillet, S., Aguedo, M., Blecker, C. (2018). Structure impact of two galactomannan fractions on their degradation kinetics in high temperature water. Submit in Carbohydrate Polymers.

Note introductive

Le chapitre précédent (6) était exclusivement consacré aux propriétés physicochimiques des galactomannanes en solutions aqueuses, et en particulier à la rhéologie. Le présent chapitre s'intéresse aux propriétés de réactivité des fractions GM25 et GM80 en conditions aqueuses à hautes température et pression (HTW). Ces conditions particulières sont décrites à la première section (Chapitre 4) et s'apparentent à des conditions d'hydrolyse acide. L'objectif spécifique du chapitre est d'évaluer l'impact de la structure des galactomannanes sur la cinétique d'hydrolyse et les produits obtenus.

Deux températures ont été étudiées (170 °C et 190 °C). Elles ont été retenues sur base d'un *screening* préalable (de 150 °C à 210 °C), afin d'obtenir une fenêtre d'observation temporelle suffisante et en adéquation avec la réalisation pratique de l'échantillonnage. L'optimisation des rendements d'hydrolyse n'était pas ciblée dans ce cas.

L'approche abordée pour traiter cette thématique, ainsi que les principaux résultats qui en découlent sont représentés au schéma ci-dessous.



Introduction	179
Materials and methods.....	182
Locust bean gum purification	182
HTW hydrolysis.....	182
Fractions characterization.....	183
Results and discussion.....	185
Structural characterization	185
Polymers degradation.....	186
Mono- and oligomers production.....	188
Hexoses degradation.....	192
Discussion.....	194
Conclusions	198
References	199

1. Abstract

High temperature water (HTW) was employed to investigate locust bean gum galactomannans behavior during autohydrolysis as well as the impact of the galactomannans structures on the kinetic of hydrolysis and the products obtained. The precedence of α bonds breaking on β bonds was highlighted. Nevertheless, mannose-mannose bonds ruptures occurred early in the HTW hydrolysis, to generate monomers and short oligomers. These were initially dominated by DP > 1 before evolving into hexoses as the hydrolysis time increased. These monomers were progressively degraded into smaller molecules including HMF and 2F. Each of these phenomena was a part of a dynamic process, in parallel with other reactions, rather than a series of distinct stages separated chronologically. The structural differences within polymers (however close) generated different kinetics of hydrolysis. The greater presence of lateral galactosyl substituents thus seemed to play a protective role on the breakdown of glycosidic bonds (α or β).

2. Introduction

For many years – and with the aim of proposing solutions to the finiteness of fossil resources and their impact on the environment [1, 2] – attempts to valorize the constituents of the lignocellulosic biomass have been made in order to produce alternatives to petro-sourced molecules as well as new compounds with higher added-value [3]. Thus, cellulose [4, 5, 6] and lignin [7, 8] have already been extensively studied. Hemicelluloses, comprising varied structures, have attracted less attention so far. In a logic of an integrated biomass refinery enabling cost-effective processes, however, hemicellulose recovery has to be considered. One of the main approaches towards hemicellulose valorization has been via the production of bulk chemicals through depolymerization [9]. However, in order to make biorefining more competitive, the production of compounds with higher added-value must also be targeted. A promising strategy involves hydrolysis of hemicellulose type polymers into oligomers with prebiotic properties. Further processing of hemicellulose also allows obtaining platform molecules. Few studies have been published on the hydrolysis of hemicellulose from agricultural byproducts [10, 11], but galactomannans remain much less considered from this point of view.

Locust bean gum (LBG) or carob gum is a polysaccharide used in the food industry as additive (E410) for its rheological, texturing and gelling properties [12]. LBG is made from the endosperm of the seeds of the carob tree (*Ceratonia siliqua* L.) and is composed of reserve polysaccharides called galactomannans (GM), whose structure is of hemicellulose type. Galactomannan structure, and thus resulting properties and function, are dependent upon its biomass source. Additionally, the isolation process of galactomannans is a crucial factor in determining structure and resulting properties and reactivity of the material. Galactomannans consist of a β -(1 \rightarrow 4)-D-mannopyranosyl backbone substituted to varying degrees at α -(1 \rightarrow 6) with single D-galactopyranosyl residues [13]. The basic structure is the same for all galactomannans. Three elements, however, allow distinction between these polysaccharides: (i) the degree of galactose substitution (DS_{Gal}), (ii) the molecular weight, and (iii) the distribution pattern of galactosyl substituents along the main chain of mannans [14]. The fine structure of galactomannans of locust bean is most likely composed of "smooth" zones (lowly substituted) and "hairy" zones, i.e. much denser in side-galactosyls, without being systematically adjacent [15]. In the case of locust bean gum, DS_{Gal} is around 0.25. Carob galactomannans have an estimated molecular weight between 300,000 and 800,000 g/mol, according to the determination methods. This corresponds to average chain lengths from 1500 to 4000 mannosyl residues [16]. The galactosyl distribution of locust bean gum is rather of the "block" type. Substituted blocks contain an average of 25 mannose residues [17]. As a comparison, guar gum has a regular primary structure. The average structure of the gum may be influenced by the purification of the gum [18] and in particular by the working temperature [12]. This can strongly impact the rheological properties [19]. In addition to their rheological properties [20], GM can also be used as a source of production of mannooligosaccharides (MOS), interesting value-added compounds, generated via depolymerization. MOS (including galactomanno-oligosaccharides) are well known as prebiotics [21] and have already demonstrated their efficacy on chicken [22] or rabbits [23] by reducing pathogen bacteria, enhancing growth of desirable microorganisms within the intestine microflora, and allowing an improvement in animal growth. MOS therefore allow a reduction of antibiotic use in feed as well as a potential use in food formulation. Locust bean gum hydrolysates can also be used in hair cosmetic formulations for volume gain [24].

Like most hemicelluloses type polysaccharides, galactomannans can be hydrolyzed according to several techniques such as enzymatic degradation, chemical degradation or microwave degradation. A method of choice for the pretreatment of lignocellulosic biomass is the hydrolysis in high temperature water (HTW) or hot compressed water (HCW), also known as vapocracking. HTW hydrolysis is based

on the fact that water heated under isochoric conditions has different physical and chemical properties from those at ambient temperature and atmospheric pressure. Indeed, under HTW conditions, the water solvent properties are modified such that: i) density decreases and hydrogen bonds become weaker; ii) the dielectric constant decreases, which leads to a decrease in polarity, mimicking organic solvents; iii) the translational and rotational movement of molecules are weaker because of the reduction in hydrogen bond strength, leading to an increase in diffusivity; iv) the ionic product increases which leads to a higher number of H_3O^+ and OH^- ions. These changes also lead HTW to support ionic reactions, polar non-ionic reactions and radical reactions [9, 25]. Moreover, HTW technologies has the advantage of involving water autocatalysis, being organic-solvent free and limiting corrosion or the use of toxic compounds, which is in phase with the principles of green chemistry [26]. Autohydrolysis/hydrothermal processes of biomass have similar mechanisms as dilute acid hydrolysis: both being hydrolysis processes catalyzed by hydronium ions (H_3O^+). In autohydrolysis where water is the only reactive, first stage hydronium ions coming from water auto-ionization catalyze the depolymerization of polysaccharides by selective hydrolysis of both glycosidic linkages and acetyl groups. In a second step, hydronium ions coming from generated acetic acid also act as catalysts, improving reaction kinetics [27].

Therefore, when submitted to HTW, hemicelluloses usually lead initially to the formation of polysaccharides of shorter chains as well as oligosaccharides by hydrolysis of glycosidic bonds of polyholosides chains [27]. The hemicellulose oligomers in solution are partially further hydrolyzed to monomeric sugars and sugar degradation products that include hydroxymethylfurfural (HMF) formed from hexoses and 2-furfuraldehyde (2-F) obtained preferentially from pentoses and uronic acids [28]), both by dehydration reactions [29]. These compounds can further undergo decomposition reactions, yielding formic and levulinic acids [27, 30, 31, 32] as well as aldehydes or insoluble carbon compounds [33, 34].

Therefore, galactomannans are useful materials and their valorization is key for cost-effective, integrated biorefineries.

This study aims to establish the link between the structure of galactomannans and their degradation kinetics in HTW, and thus bring new insights of the mechanisms of autohydrolysis of complex branched polysaccharides and their ability to produce bulk chemicals and/or higher value compounds. To achieve this, LBG gum was purified by solubilization respectively at 25 °C and 80 °C in order to obtain two fractions with different chemical structures and properties. Both fractions were fully

characterized and hydrolyzed in water at 170 ° C and 190 ° C. Samples collected over reaction time were characterized. HTW reaction kinetics of the two fractions are identified and compared, and finally related to their structural properties.

3. Materials and methods

3.1. *Locust bean gum purification*

Crude locust bean gum (CLBG) was obtained from PFW Ltd. (Greenford, UK) as the product sold under the trade mark name HERCOGUM N1. All other chemicals were purchased from commercial suppliers and used as received. A purified hot extract (GM80) and a purified cold extract (GM25) were obtained respectively from 80 °C and 25 °C subtractive fractionation treatment of the CLBG sample. Fractionation, analyses of composition and structures determination of galactomannans (GM) fractions were carried out for and as described in our previous study [15], resulting in two fully characterized fractions that were used as starting material in the present study.

3.2. *HTW hydrolysis*

Fractions GM25 and GM80 were subjected to HTW conditions to induce their hydrolysis. This took place in a 7-L Parr reactor (Parr USA, Moline, Illinois, USA) with temperature and pressure control. A valve-sampling system was connected to the reactor. The sampling system was coupled to a refrigerant and samples were taken along hydrolysis time. The sampling system was rinsed with distilled water between samples. 3.5 L of 1,5 % GM25 or GM80 solutions were introduced into the reactor and heated to the set temperature (170 °C or 190 °C). The first sampling was carried out when the set temperature was reached (about 1 hour). From this moment, samples were collected every 20 min for 5 hours. The pressure within the reactor was 8 bar. Each hydrolysis reaction was carried out in triplicate. The hydrolysis temperatures (170 °C and 190 °C) were selected empirically based on a screening of a wider temperature range. At both selected temperatures, the polymers degrade and maximize the production of oligomers. Additionally, the conditions were not too drastic and the evolution of the polymers degradation remained observable over time through sample analyses.

3.3. Fractions characterization

After cooling, the pH of each sample was measured with a calibrated WTW 330i pH meter (WTW, Weilheim, Germany).

Hydroxymethylfurfural (HMF) and 2-furaldehyde(2-F) were determined by UV detection at 205 nm coupled to a high-performance liquid chromatography (HPLC) instrument, Waters 2656 (Waters, Zellik, Belgium) equipped with an Agilent Zorbax 300SB-C18 column (4.6 mm, 150 mm, 5 μ m) (Agilent Technologies, Diegem, Belgium). The eluent solution was a mix of 90% of 1%-acetic acid solution in distilled water with 10% methanol, and was run at a flow rate of 1 mL per min at 30 °C. Calibration curves were established with commercial HMF and 2-F (Sigma Aldrich, Diegem, Belgium). The samples were filtered through a 0.45 μ m nylon syringe filter and 20 μ L were then injected in HPLC.

D-mannosyl and D-galactosyl residues were determined by Blakeney method [35]. Aldoses were reduced and acetylated to alditol acetates. 2-Deoxyglucose was used as internal standard. Each solution containing 3 mL of sample, 1 mL of internal standard (1 mg/mL), 1 drop of NH₄OH and 2 mL of a NaBH₄ /DMSO solution was incubated for 90 min at 40 °C. 0.6 ml of glacial acetic acid, 0.4 ml of 1-methylimidazole, 10 mL of distilled water and 3 mL of dichloromethane were then added. 1 mL of the lower phase was removed and for GC analysis.

Gas chromatography analyses were performed on a HP Agilent 6890 series chromatograph (Agilent Technologies, Diegem, Belgium) with a flame ionization detector equipped with HP-1 capillary column (30 m x 32 mm, 0.25 μ m film thickness) coated with methylsiloxane. 1 μ L-samples were injected in splitless mode. Initial oven temperature of 120 °C was increased to 220 °C at a rate 4 °C/min. Helium was used as the carrier gas with a flow rate of 1.6 mL/min. The temperature of the injector and the detector were 290 °C and 320 °C, respectively. From the collected data, the evolution of M/G ratios for galactomannans polymerized residues during the hydrolysis time can be calculated as well as polymerization rates: $\%_{\text{polymerized}} = [m_{\text{initial polymer}} - (m_{\text{free galactose}} + m_{\text{free mannose}})] / m_{\text{initial polymer}} * 100$; $m_{\text{polymerized mannose}} = [m_{\text{initial polymer}} / (M/G_{\text{initial}} + 1) * M/G_{\text{initial}}] - m_{\text{free mannose}}$; $m_{\text{polymerized galactose}} = [m_{\text{initial polymer}} / (M/G_{\text{initial}} + 1)] - m_{\text{free galactose}}$; $M/G_{\text{résidual polymer}} = m_{\text{polymerized mannose}} / m_{\text{polymerized galactose}}$.

The scattering light from a polydisperse macromolecular solution was used to determine the molecular weight (Mw) distribution. This was obtained by the Zimm method, i.e. the scattering intensity is measured at different angles and concentrations, followed by an extrapolation to zero angle and zero concentration. This procedure gives the absolute value of the weight average Mw [36]. Measurements were determined in triplicate using a high-performance size exclusion chromatography (HPSEC) HP 1200 series apparatus (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA), coupled to a BI-DNDC refractometer and a BI-MwA multi-angle laser light scattering (MALLS) (both from Brookhaven Instruments Co., Holtsville, NY, USA).

Analyses of high molecular weight GMs (1 to 1000 kDa) were carried out on a system equipped with two TSK-gel GMPWxl columns (30 cm x 7.5 mm; particle size 13 μ m) (Tosoh Corporation, Tokyo, Japan) connected in series and connected to a pre-column. The mobile phase was an aqueous solution of 50 mmol/L NaNO₃ and 0.05% NaN₃, with a flow rate of 0.7 mL/min at 40 °C. Samples solutions were filtered through 0.45 μ m syringe filters prior to injection of 100 μ L. Analyses of low molecular weight GMs (< 1 kDa) were carried out on a system equipped with a pre-column and two columns, one TSK- gel G2500PWXL (30 cm x 7,8) and a TSK-gel GMPWxl (30 cm x 7.5 mm; particle size 13 μ m) (Tosoh Corporation, Tokyo, Japan) connected in series. The mobile phase was distilled water with a flow rate of 0.5 mL/min at 40 °C. Samples solutions were filtered through 0.45 μ m syringe filters prior to injection of 100 μ L. A refractive index increment (dn/dc) of 0.145 mL/g was used for SEC-MALLS/RI determinations [37]. This technique makes it possible to separate the monomers and oligomers directly on the basis of their DP, without distinction in the nature of the hexoses nor in the branched or linear structure of the oligomers. DP1-5 were identified based on retention times, from commercial standards with DP1-5 (mannose series). Quantification of the DP1-5 was carried out with a calibration curve, based on solutions of increasing concentrations of sucrose. DP1-5 concentration was estimated by the sum of each monomer and oligomer.

Polymer presence in some samples was checked with MALDI time-of-flight mass spectrometer (MALDI-TOF). Applied to our galactomannan samples, the technique is not quantitative or precise. However, it allows to qualitatively detect the presence or absence of polymerized structures in a narrow range confined between DP 20 and DP2. High resolution mass spectra were recorded on an Ultraflex MALDI time-of-flight mass spectrometer (Bruker Daltonic) operating in the reflector and linear positive or negative mode using a pulsed nitrogen laser (l 337 nm, pulse rate of

10 Hz) as the ionization source. The analyzer was used at an acceleration voltage of ± 20 kV. Laser light was focused on the sample using a 5.2 kV lens. A pulsed ion extraction was optimized to 200 ns. An inulin calibration set was used as the external standard. For each galactomannan sample, MALDI-TOF-MS was ensured on 10 distinct sample deposit zones. A total of 300 shots were provided. Each sample preparation and analysis were duplicated. A 2,5 dihydroxybenzoic acid (DHB) matrix was prepared by mixing 10 mg DHB in 1 mL water containing 0.1 vol.% trifluoroacetic acid (TFA).

4. Results and discussion

4.1. *Structural characterization*

The fractionation process generated two pure galactomannan fractions (> 99.9%) with different chemical structures, for which a schematized representation is proposed in Fig. 1. The GM25 fraction consisted of galactomannans composed of shorter chains ($M_w = 761$ kDa), richer in galactosyl (M/G ratio = 2.85), which were distributed at 70% inside “block” structures (grouped in “hairy” regions). The GM80 fraction consisted of longer galactomannans ($M_w = 911$ kDa) less substituted in galactosyls (M/G ratio = 3.84), although these were concentrated to 83% as substituted blocks (also grouped in “hairy” regions). The structural characterizations of GM25 and GM80 fractions were discussed in detail in our previous study (Gillet *et al.*, 2014b).

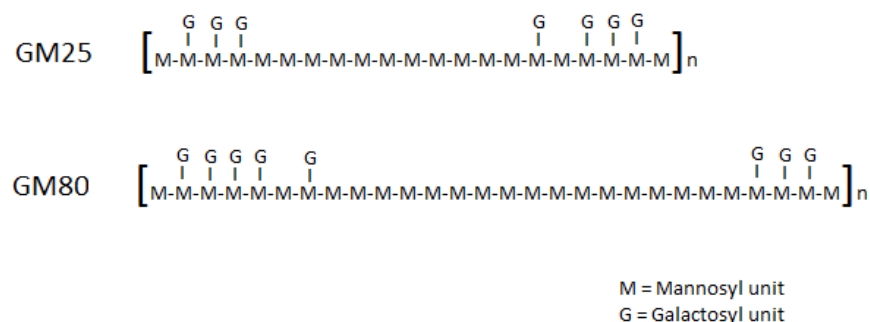


Figure 1. Schematic representation of GM25 and GM80 fractions structure. M and G are respectively mannosyl and galactosyl units. According to [15], with permission from Elsevier.

4.2. Polymers degradation

The primary expected impact of HTW on GM25 and GM80 fractions during treatment was a decrease in the size of the chains deriving from the breaking of links between mannosyl units of the main backbone. Size-exchange chromatography (HP-SEC) analysis of the HTW hydrolysis samples, respectively at 170 ° C and 190 ° C, allowed to determine the average Mw of the GM25 and GM80 fractions and therefore their changes over time (Fig 2a & 2b).

The Mw of the polymers decreases over time. This means that, as expected, glycosidic linkages between mannosyl units of the galactomannan main backbone were hydrolyzed to generate increasingly smaller poly- then oligo-saccharidic fragments.

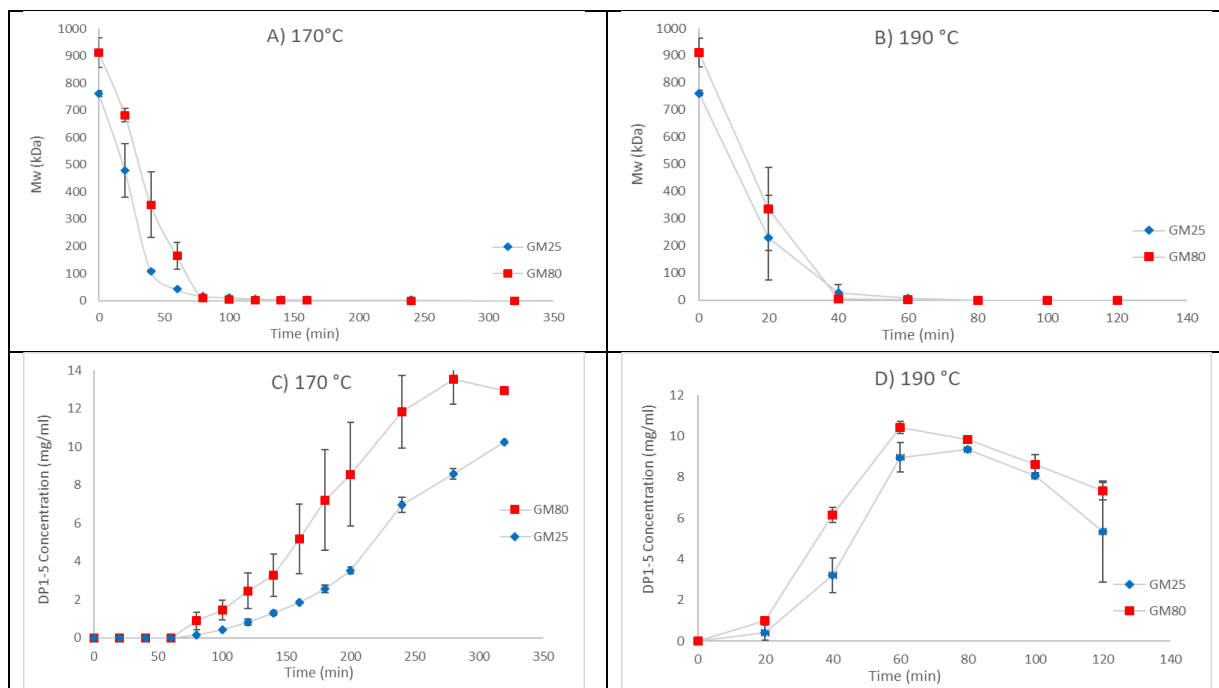


Figure 2. HP-SEC measurements. Change in Mw of the GM25 and GM80 fractions during HTW hydrolysis, respectively at 170 °C (A) and 190 °C (B) and DP1-5 quantification for GM25 and GM80 fractions, respectively at 170 °C (C) and 190 °C (D).

At 170 °C, a hydrolysis time of 80 min is necessary to eliminate most of the polysaccharide structures of the GM25 and GM80 fractions. The GM25 fraction also shows a more drastic reduction of Mw during the first minutes of the HTW hydrolysis. Both fractions also have similar kinetics of reduction of Mw at 170 °C. After 80 min, however, a shift of the GM25 and GM80 curves is observed. Mw_{GM25} becomes higher than Mw_{GM80} , which was initially greater. At 190 °C, a hydrolysis time of 40 min led to the disappearance of the polysaccharide structures of both fractions. This time is significantly shorter than for hydrolysis at 170 °C. Both fractions also have similar kinetics of reduction of Mw at 190 °C. After 40 min, however, a shift of the GM25 and GM80 curves is observed. Again, Mw_{GM25} becomes higher than Mw_{GM80} . The shifts observed at 80 min (170 °C) and 40 min (190°C) seem to indicate that the most branched fragments generated in the GM25 fraction are more resistant to HTW hydrolysis.

4.3. *Mono- and oligomers production*

HP-SEC also allows to quantitatively determine monomers (DP1) and small oligomers with DP 2 to 5, regardless of their structure or of the nature of the hexoses. Fig. 2c and 2d show the evolution of compounds with DP 2 to 5, during the hydrolysis time, for GM25 and GM 80 fractions, respectively at 170 °C and 190 °C.

At 170 °C, the release of small oligomers starts after 60 min of hydrolysis and increases continuously until the end of the experiment. The GM80 fraction generates quantitatively more monomers and small oligomers. At 190 °C, the formation of DP1-5 starts at 20 min and increases until a peak appears at 60 min. Beyond this peak, the small oligomers concentrations gradually decrease, indicating that they degrade themselves into smaller compounds. The profile of both GM80 and GM25 curves are similar, although the GM80 fraction generates slightly shorter oligomers. Below the concentration peaks, the curves at 190 °C have the same shape and the same trend as those at 170 °C over the entire hydrolysis period. At both temperatures, the structure of the GM80 fractions seems more suitable for breaking inter-manosyl glycosidic linkages, to produce monomers and small oligomers.

Free hexoses (galactose and mannose) concentrations were also measured with GC-FID in the collected samples during hydrolysis in HTW. Fig. 3 represents the concentration over time of mannose and galactose for GM25 and GM80 fractions, at 170 °C and 190 °C.

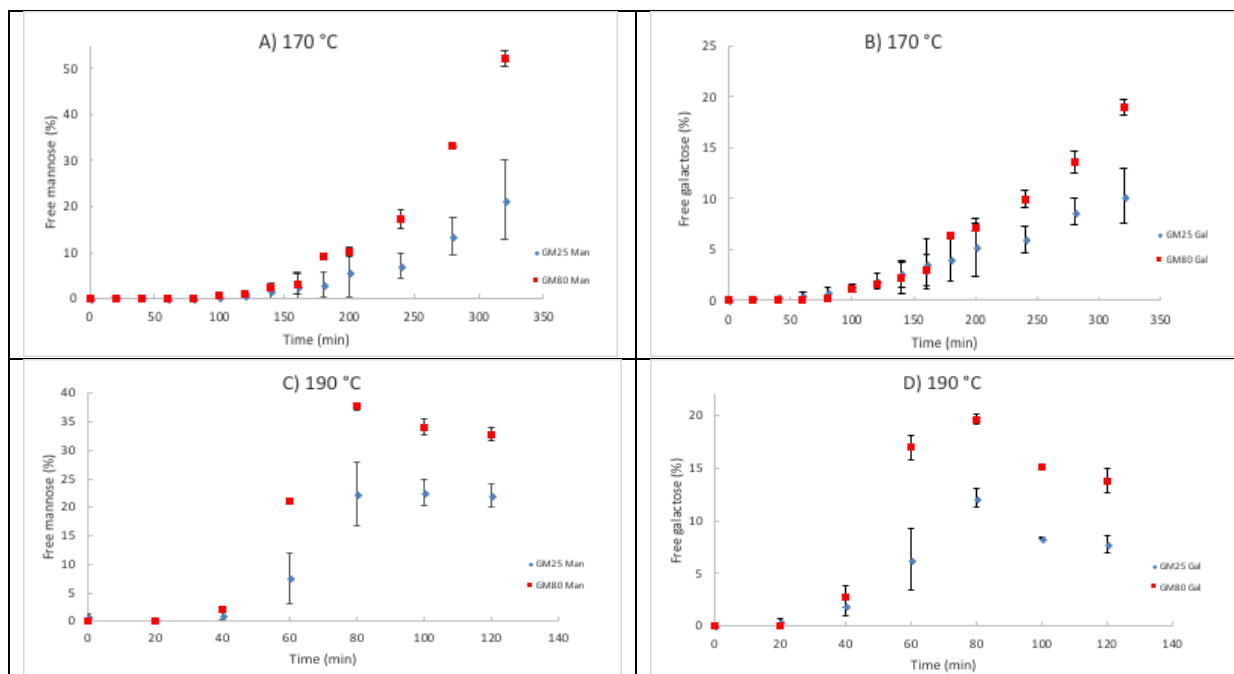


Figure 3. Evolution over time of: A) Mannose concentration, for GM25 and GM80 fractions at 170 °C ; B) Galactose concentration, for GM25 and GM80 fractions at 170 °C ; C) Mannose concentration, for GM25 and GM80 fractions at 190 °C ; D) Galactose concentration, for GM25 and GM80 fractions at 190 °C.

At 170 °C, galactose and mannose concentrations increase with hydrolysis time in the medium for GM25 and GM80 fractions. At 190 °C, the concentrations increase in the medium before dropping for both fractions. At 170 °C however, the GM80 fraction generates more mannose and galactose than the GM25 fraction. This is paradoxical because it contains less galactose initially in its structure than GM25 (GM80 M/G ratio of 3.84, and 2.85 for GM25). This could mean that a low laterally substituted structure is more suitable to lose its galactosyls. As a corollary, the shorter and more substituted chain structure of the GM25 fraction appears to make it more resistant to hydrolysis since fewer hexose residues are released into the medium during HTW hydrolysis. At 190 °C, the same trend is observed. The GM80 fraction yields more mannose and galactose than the GM25 fraction. At this temperature, a peak of concentrations in mannose and galactose is observed after 80 min of hydrolysis before a decrease occurs. This means that some of the released hexoses have been degraded when hydrolysis under more severe conditions was maintained. The peak is also more important for galactose than for mannose, which may suggest that galactosyl residues were degraded more rapidly into smaller molecules than mannosyl residues. Thus, at 170 °C, the maximum yield of hexose of the GM80 fraction is around 70% after 320 minutes. At 190 °C, the hexose yield is maximum (about 60%) at 80 minutes. The observed trends are the same for the GM25 fraction at 170 °C and 190 °C and the maximum yields are respectively about 30% (320 min) and 35% (80 min).

From the collected data, it was also possible to estimate numerically (calculated) and by difference the evolution of M/G ratios for galactomannans polymerized residues during the hydrolysis time. Polymerization rates of the initial GM25 and GM80 fractions over time were also estimated (Fig. 4).

At 170 °C, M/G ratios increase. This means that the hydrolysis occurs preferentially on the side chains. The trend is even more pronounced for the GM80 fraction. At 170 °C, 200 min are required before witnessing a significant decrease in the average DPs of GM25 and GM80. After 320 min, there is no more GM80 in a polymerized form. This is consistent with the observations in Fig. 2A and 3A. At these temperatures and reaction times, both fractions were converted essentially into hexoses. The MALDI-TOF analyses also confirm the absence of polymerized (DP > 20) structures in these last samples (time higher than 300 min) (results not shown).

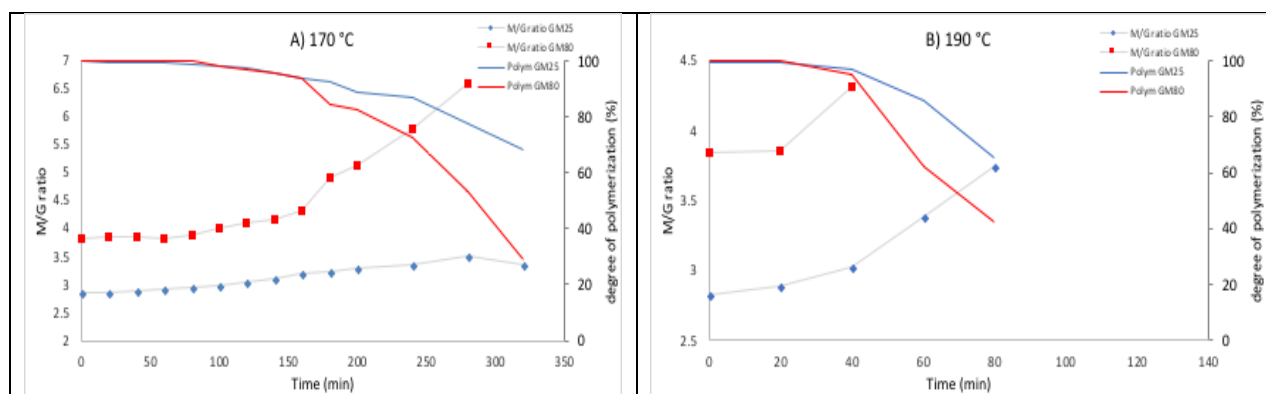


Figure 4. Evolution of M/G ratios and polymerization rates for galactomannans polymerized residues during the hydrolysis time, for GM25 and GM80 fraction at : A) 170°C ; B) 190 °C.

At 190 °C, the observed trend is the same. The M/G ratio increases. The effect is however much faster. Beyond 40 min of hydrolysis time, there are no more lateral galactosyls linked on the GM80 fraction. The M/G ratio is therefore theoretically infinite. The same phenomenon occurs after 80 min for the GM25 fraction. The graph is, however, more difficult to interpret with regards to the two degradation kinetics occurring jointly: i) the degradation of galactomannans into hexoses, and ii) the degradation of hexoses into smaller molecules (see below). The decrease in average DP for GM25 and GM80 fractions is also much faster than during the hydrolysis at 170 °C. The calculated curves shown on the graph are nevertheless distorted with the simultaneous degradation of hexoses into smaller molecules. Their slopes should therefore logically be steeper, which means that the depolymerization occurs even more quickly than observed on Fig. 5B. MALDI-TOF analyses confirmed the absence of polymerized structures beyond 100 minutes (results not shown). This means that under these conditions and at this stage of hydrolysis, the samples consist essentially of hexoses.

4.4. Hexoses degradation

HMF and 2-furfural (2-F) originate from saccharides degradation [28]. They are therefore an indicator of the hydrolysis degree. Fig. 5A and 5C show that the concentrations of HMF and 2-F increase with time during hydrolysis at 170 °C. However, the HMF concentration is significantly higher than the 2-F concentration, which is consistent with the observations that 2F usually originates from pentoses [28]. At 170 °C, the GM80 fraction also generates higher HMF concentrations than those produced by the GM25 fractions (Fig. 5A), while the 2-F concentrations in both fractions are similar (Fig 5C). The observed differences in HMF production clearly indicate that the GM80 fraction degrades faster than the GM25 fraction at 170 °C. Fig. 6B shows that the concentration of HMF increases with time during the hydrolysis at 190 °C. Both fractions (GM25 and GM80) show no significant difference in behavior. At 190 °C, HMF and 2-F concentrations (Figs 5B and 6D) also increase much faster than during hydrolysis at 170 °C (Fig. 5A and 5C). The GM25 fraction seems to generate slightly more 2-F at 190 °C than the GM80 fraction (Fig. 5D). Fig. 5E and 5F shows evolutions of the pH for GM25 and GM80 solutions, during the HTW hydrolysis for both temperatures studied. At 170 °C, the pH decreases during the hydrolysis, but there is no significant difference between the two LBG fractions. The decrease in pH is explained by sugars degradation into small molecules with acid character such as formic and levulinic acids and is therefore another indicator of the hydrolysis degree. During the hydrolysis at 190 °C, the pH decreases faster. A pH of 3.5 is reached after 180 min of hydrolysis (i.e. 2

h after the set temperature is reached), whereas it's not the case after 360 min at 170 °C. At 190 °C, the GM80 fraction has a slightly lower pH than the GM25 fraction but the difference is minimal.

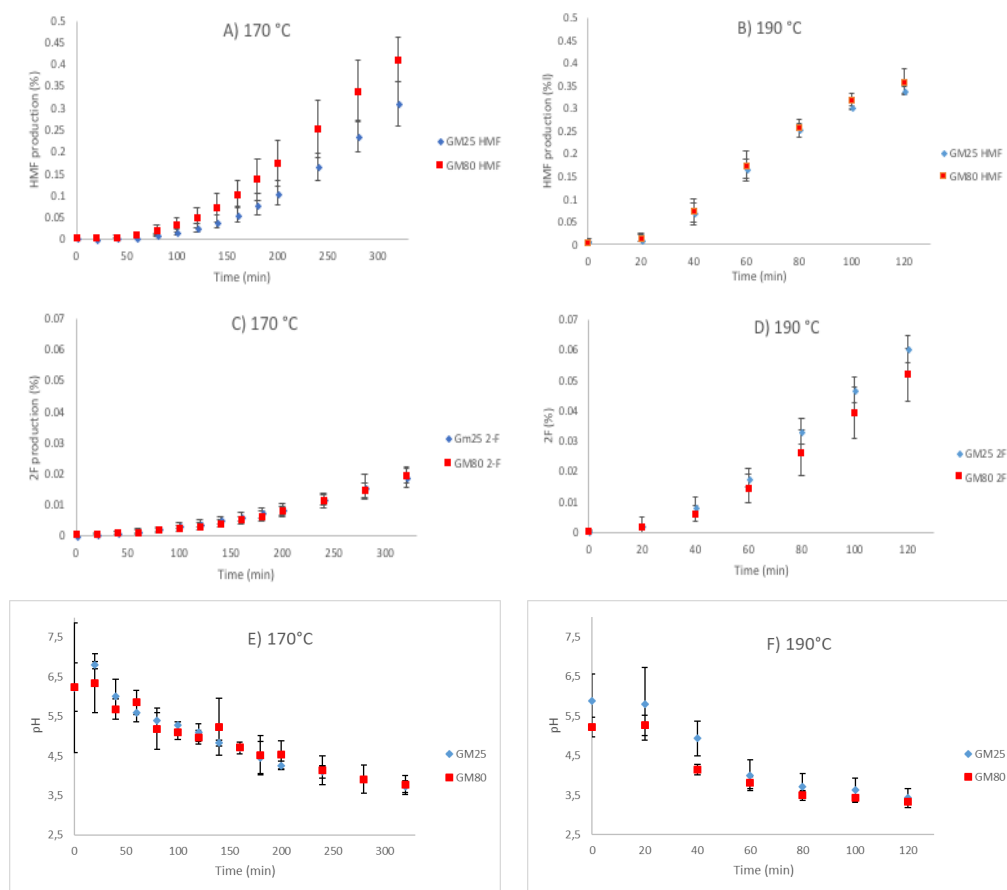


Figure 5. Hexoses degradation products. Hydroxymethylfurfural (HMF) production from GM25 and GM80 fractions (%), respectively at 170 °C (A) and 190 °C (B); 2-furfural (2-F) production from GM25 and GM80 fractions (%), respectively at 170 °C (C) and 190 °C (D). Evolutions of the pH for GM25 and GM80 solutions during the HTW respectively at 170 °C (E) and 190 °C (F).

5. Discussion

During the first minutes of the hydrolysis, the Mw decreases rapidly by rupture of the glycosidic linkages between mannosyl residues, revealing oligomeric fragments with reduced sizes. In conjunction with the breaking of inter-mannosyls bonds, a larger amount of monomers and short oligomers (DP2-5) are generated. When breaking start, most of them consist of DP > 1. At the end of hydrolysis, hexoses (DP1) dominate the mixture. This means that hydrolysis occurs progressively from larger fragments to unitary structures (rather than a cleavage hexose by hexose from the main chain extremity).

During the hydrolysis over time, increasing amounts of hexoses are produced. In terms of kinetics, galactose is released faster than mannose (the M/G ratio of residual fragments increases over time). This indicates that a larger amount of α bonds than β bonds breaks. This could be explained in purely probabilistic terms. Cleavage of the galactosidic bond directly releases galactose while cleavage of any mannosidic bonds gives a longer chain. Therefore, formation of mannose required at least 2 cleavages on neighbored sides. After a first Man-Man cleavage, the possibilities of breaking α bonds are in general (except for shorter fragments) still wider than for the β linkages able to release hexoses (Fig. 6A). This could also be explained by the electronic environment around α and β linkages. The α and β bonds of the galactomannan chain are respectively in diaxial and equatorial position. The α -branched galactose is in axial position against the mannose, generating a steric hindrance between the two oxygen atoms, and favoring the interaction of the pyranose oxygen lone pair to weaken the α acetal bond (Fig. 6). This is known as the anomeric effect, and favors nucleophilic attack at the anomeric carbon, particularly in acidic conditions which can further activate the anomeric acetal (render it more electron withdrawing). The axial position also suffers from destabilizing dipole interactions (resulting from the pyranose oxygen and acetal oxygen dipoles being aligned in the same direction), and electrostatic repulsion of the oxygen lone pairs which is greater than in the case of the β conformer. The mannose chains are engaged in β bonds in equatorial positions. The equatorial position is comparatively stabilized, and therefore the mannose chains have a relatively slower hydrolysis reaction kinetics than α -linkages. Furthermore, a conformational change is required for cleavage and oxocarbenium ion formation. This is probably more difficult for the β -1,4-mannan chain compared to the already α -configured and more flexible Gal residue. Both phenomena could explain the faster breakdown of the α bonds weakened by the anomeric effect, than the β bonds

which similarly are broken by nucleophilic attack (Fig. 6b). Field effects, related to axial and equatorial OH, also play a role in the electronic effect controlling glycoside reactivity [38, 39]. The field effect imposed by an electron-withdrawing group is less when placed axially than equatorially. However, it remains difficult to assess on very long polymer structures.

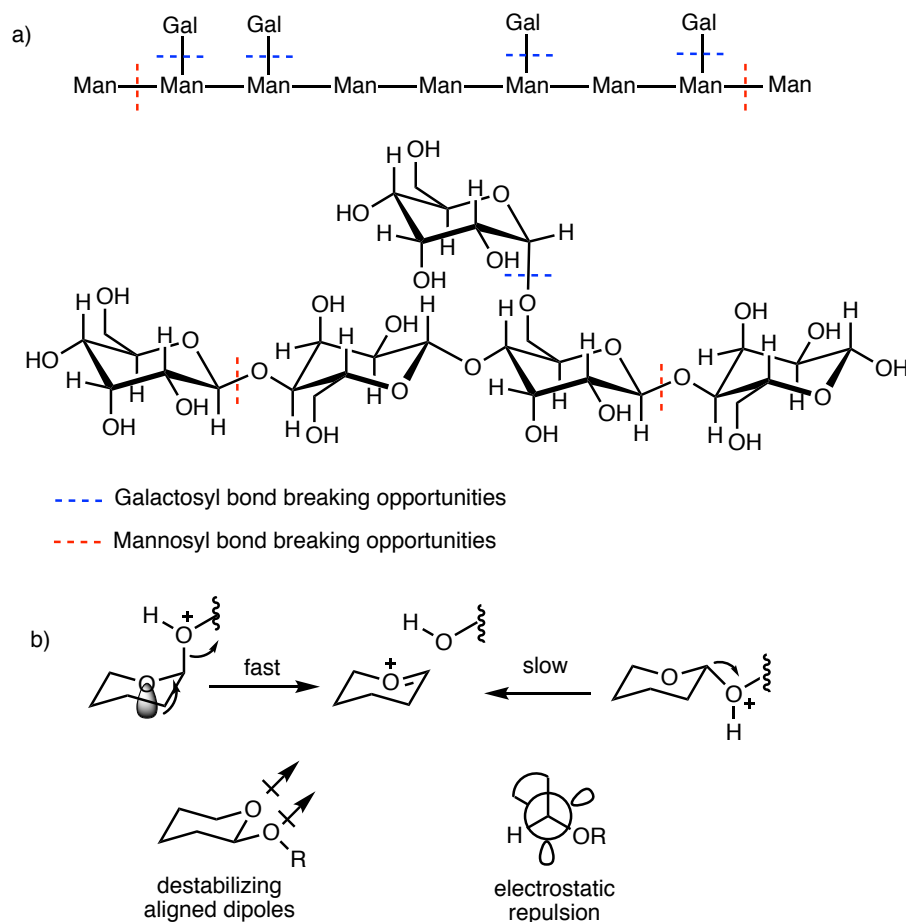


Figure 6. α and β bonds breaking. (A) probabilistic opportunities; (B) influence of the electronic environment.

These observations can also be compared to the mechanisms in carbohydrate chemistry in acidic conditions since HTW conditions seem to generate a transition state with its developing charge which is similar to the oxocarbenium intermediate found during acidic-catalyzed hydrolysis. [40] showed that in case of methyl glycosides β -linkages are faster hydrolyzed than α (first-order rate constants for acidic hydrolysis are greater for β -linkages). In case of disaccharides, the trend is reversed, and α -linkages are faster cleaved. Thus galactosyl- β -1,6-glucose show a first-order rate constant for hydrolysis higher than mannosyl- β -1,4-mannose. It can therefore be expected that galactosyl- α -1,6-glucose is even faster hydrolyzed. This is in full agreement with the observation in HTW.

When the temperature increases (190 °C), the conditions become more drastic and the hexoses degrade more quickly into molecules with smaller sizes including 2-F and HMF. Their concentration, however, is not directly and solely correlated with a decrease in the concentration of hexoses in the medium. HMF and 2-F are very quickly present in the medium and then increase gradually. This means that the degradation of hexoses is a dynamic phenomenon that occurs continuously along hydrolysis, from the moment they are released into the medium (and not necessarily after a long time or when hexose concentrations become higher in the medium).

When the GM25 and GM80 fractions (which have different structures) are compared during the HTW hydrolysis, some differences appear. The decrease in average Mw appears similar for both fractions, at both temperatures tested. When the hydrolysis is prolonged, a shift is observed between the Mw curves. The GM25 fraction, with a lower initial Mw, generates more stable fragments than those of the GM80 fraction (shift of 170 °C at 80 min and shift of 190 °C at 40 min). At this stage, the larger presence of galactosyls seems to favor the resistance of smaller oligomeric fragments generated by breaking of inter-mannosyl bonds. Moreover, the amount of small oligomers (DP2-5) is greater for GM80 than for GM25 (Fig. 4). This is in phase with the greater stability of oligomeric fragments of GM25, previously observed (Fig. 3).

In terms of hexose releases, the GM80 fraction generates much more galactose than the GM25 fraction at both temperatures tested. This may seem paradoxical because the GM80 fraction initially possess fewer galactosyl substituents. The simple probabilistic law mentioned above, or the near electronic environment, no longer seems sufficient to explain the observed results. Two different but non-exclusive concepts would make it possible to interpret our observations.

A potential hypothesis for the observed effect could lie in the ability of galactosyl substituents to interact with each other through H-bonding. This interaction, more pronounced in areas with greater galactosyl substitution density, could lead to enhancement of the destabilization of α -linkages, and the faster release of galactose relative to mannose. This could occur in particular in highly substituted areas of GM80 fractions, which, although presenting overall fewer galactosyl substituents than GM25, shows a more concentrated galactosyl distribution along the chain. Steric hindrance with high galactosyl substitution density may also further labilise the α -linkages leading to faster galactosyl release in GM80 chains.

On the other side, the three-dimensional organization of the galactomannan network is different according to the concentration regime. In the diluted regime ($C < C^*$, with C^* the critical concentration), the galactomannan chains have a random coil conformation [41], which can vary according to the mode of distribution of the lateral D-galactosyls [42]. The greater presence of smooth areas - like for the GM80 fraction - favors intra-chain interactions ("hydrophobe" interactions) which reduce the hydrodynamic volume [41, 43] and push back the galactosyl substituents at the periphery of the coil (and therefore in direct contact with the medium). In the concentrated regime ($C > C^*$), the individual coils interpenetrate and generate, in the presence of unsubstituted areas, stronger interactions than simple physical overlaps (entanglements): the hyperentanglements [44]. These hydrophobic interactions could also repel the galactosyls at the periphery of the generated three-dimensional network. During HTW hydrolysis, the concentrated regime would probably be effective at the beginning of hydrolysis before moving towards a diluted regime (M_w decreases and thenceforth C^* increases [19]). In both cases of regime, the conformational structure of GM80 polymers or residual oligomers repels the galactosyl substituents at the periphery and exposes them directly to the HTW medium, including H_3O^+ ions (without no more protection by H bonds within the polymer structure). This would make GM80 galactosyls more readily and rapidly hydrolysable.

Mannose production is also greater for the GM80 fraction than for the GM25 fraction. This can be explained more easily. The breakdown of the α bonds occurs preferentially to the β bonds. The GM25 fraction has kinetics of α bond breaking slower than the GM80 fraction, thus, since α bonds are broken preferentially, GM25 will therefore release mannose more slowly too since β attack will occur at a lower probability.

Concerning the hexose degradation products (HMF and 2F), the curves observed for the GM25 and GM80 fractions are quite similar. The GM80 fraction, however, seems to generate more HMF than the GM25 fraction, whereas the opposite is observed in the case of 2F.

In a broader biorefinery context, it appears that milder temperatures (170 °C) or shorter reaction times at 190 °C (60 min) are required to obtain oligomers with higher added value (for their prebiotic properties). On the other hand, higher temperature or longer treatment times induce the production of bulk chemicals, as already observed on other types of hemicelluloses.

6. Conclusions

Our study allowed a better understanding of the sequence of HTW hydrolysis steps of galactomannans by the analysis of the compounds obtained at regular time intervals. The precedence of α bonds breaking on β bonds was highlighted in every case. Based on observations, the greater presence of lateral galactosyl substituents seemed to play a protective role on the breakdown of glycosidic bonds (α or β). A better understanding of reactions kinetics as well as of the polymer structure influence should allow to shift HTW hydrolysis towards selected oligomers with prebiotics properties, by selecting the material source or by varying hydrolysis settings.

7. References

- [1] Aldric, J.-M., Gillet, S., Delvigne, F., Thonart, P., 2010. Development of an original approach to evaluate effects of surfactants, biomass and pollutants on the scaling-up of a two-phase partitioning bioreactor. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 85, 356–363.
- [2] Aldric, J.-M., Gillet, S., Delvigne, F., Blecker, C., Lebeau, F., Wathélet, J.-P., Thonart, P., 2009. Effect of surfactants and biomass on the gas/liquid mass transfer in an aqueous-silicone oil two-phase partitioning bioreactor using *Rhodococcus erythropolis* T902.1 to remove VOCs from gaseous effluents. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 84, 1274-1283.
- [3] Jacquet, N., Desquay, L., Jadot, B., Kenne, T., Villani, N., Maniet, G., Bombeck, P.-L., Gillet, S., Richel, A., 2015. Commercial biorefining initiatives in Wallonia: production of biofuels and related valorization routes. A review. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 19, 197-203.
- [4] Deumaga, M., Emaga, T., Tchokouassom, R., Vanderghem, C., Aguedo, M., Gillet, S., Jacquet, N., Danthine, S., Deleu M., Richel, A., 2015. Biomass Convers. Biorefin. 5, 409-416.
- [5] Awedem Wobiwo, F., Alleluya, V., Emaga, T., Boda, M., Fokou, E., Gillet, S., Deleu, M., Gerin, P., 2017a. Recovery of fibers and biomethane from banana peduncles biomass through anaerobic digestion. *Energy Sustain. Dev.* 37, 60-65.
- [6] Awedem Wobiwo, F., Emaga, T., Fokou, E., Boda, M., Gillet, S., Deleu, M., Richel A., Gerin, P., 2017b. Comparative biochemical methane potential of some varieties of residual banana biomass and renewable energy potential. *Biomass Convers. Biorefin.* 7, 167-177.
- [7] Gillet, S., Petitjean, L., Aguedo, M., Lam, C.-H., Blecker, C., Anastas, P.T., 2017a. Impact of lignin structure on oil production via hydroprocessing with a copper-doped porous metal oxide catalyst. *Biores. Technol.* 233, 216-226.
- [8] Gillet, S., Aguedo, M., Petitjean, L., Morais, A.R.C., da Costa Lopes, A.M., Łukasik R.M., Anastas, P.T., 2017b. Engineering lignin for high value applications: towards tailor-made transformations using green chemistry. *Green Chem.* 19, 4200-4233.

- [9] Peterson, A., Vogel, F., Lachance, R., Fröling, M., Antal, M., Tester, J., 2008. Thermochemical biofuel production in hydrothermal media: A review of sub- and supercritical water technologies. *Energy Environ. Sci.* 1, 32-65.
- [10] Aguedo, M., Fournies, C., Dermience, M., Richel, A., 2014. Extraction by three processes of arabinoxylans from wheat bran and characterization of the fractions obtained. *Carbohydr. Polym.* 105, 317-324.
- [11] Aguedo, M., Ruiz, H., Richel, A., 2015. Non-alkaline solubilization of arabinoxylans from destarched wheat bran using hydrothermal microwave processing and comparison with the hydrolysis by an endoxylanase. *Chem. Eng. Process.* 96, 72-82.
- [12] Gillet, S., Blecker, C., Paquot, M., Richel, A., 2014a. Chemical structure – physical properties of galactomannans extracts from locust bean, *C. R. Chim.* 17, 386-401.
- [13] McCleary, B., 1980. Hydrolysis of galactomannans by α -d-galactosidase and α -d-mannanase. In J. John Marshall (Ed.), *Mechanisms of saccharide polymerization and depolymerization*, New York: Academic Press, pp. 285-300.
- [14] Dea, I., Morrison, A., 1975. Chemistry and interactions of seed galactomannans, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 31, 241-312.
- [15] Gillet, S., Blecker, C., Aguedo, M., Laurent, P., Paquot, M., Richel, A., 2014b. Impact of purification and process on the chemical structure and physical properties of locust bean gum, *Carbohydr. Polym.* 108, 159-168.
- [16] Richardson, P., Willmer, J., Foster, T., 1998. Dilute solution properties of guar and locust bean gum in sucrose solutions, *Food Hydrocoll.* 12, 339–348.
- [17] Daas, P., Schols, H., de Jongh, H., 2000. On the galactosyl distribution of commercial galactomannans. *Carbohydr. Res.* 329, 609–19.
- [18] Gillet, S., Simon, M., Paquot, M., Richel, A., 2014c. Review of the influence of extraction and purification process on the characteristics and properties of locust bean gum, *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 18, 97-107.
- [19] Gillet, S., Aguedo, M., Petrut, R., Olive, G., Anastas, P., Blecker, C., Richel, A., 2017c. Structure impact of two galactomannan fractions on their viscosity properties in dilute solution, unperturbed state and gel state. *Int. J. Biol. Macromol.* 96, 550-559.
- [20] Dakia, P., Blecker, C., Robert, C., Wathelet, B., Paquot, M., 2008. Composition and physicochemical properties of locust bean gum extracted from whole seeds by acid or water dehulling pre-treatment. *Food Hydrocoll.* 22, 807–818.
- [21] Pangri, P., Piwpankaew, Y., Ingkakul, A., Nitisinprasert, S., Keawsompng, S., 2015. Characterization of mannanase from *Bacillus circulans* NT 6.7 and its

application in mannooligosaccharides preparation as prebiotic. SpringerPlus, 4, 771-781.

[22] Utam, W., Meryandini, A., Wiryawan, K., 2013. Characterization of Bacterial Mannanase for Hydrolyzing Palm Kernel Cake to Produce Manno-oligosaccharides Prebiotics. Media Peternakan, 192-196.

[23] Mourão, J.L., Pinheiro, V., Alves, A., Guedes, C.M., Pinto, L., Saavedra, M.J., Spring, P., Kocher, A., 2006. Effect of mannan oligosaccharides on the performance, intestinal morphology and cecal fermentation of fattening rabbits. Anim. Feed Sci. Tech. 126, 107–120.

[24] Fabre, B., Fiorini-Puybaret, C., 2008. Composition cosmétique comprenant un hydrolysate de gomme de caroube. WO 2010/072801 A1. PCT/EP2009/067831.

[25] Akiya, N., Savage, P., 2002. Roles of water for chemical reactions in high-temperature water. Chem. Rev. 102(8), 2725–50.

[26] Anastas, J.C., P.T., W., 1998. Green Chemistry: Theory and Practice. Oxford University Press, Oxford, UK.

[27] Carvalheiro, F., Duarte, L., Girio, F., 2008. Hemicellulose biorefineries: a review on biomass pretreatments. J. Sci. Ind. Res. 67, 849-864.

[28] Chen, W., Lawoko, M., Van Heiningen, A., 2010. Kinetics and mechanism of autohydrolysis of hardwoods. Biores. Technol. 101, 7812-7819.

[29] Chheda, J., Huber, G., Dumesic J., 2007. Liquid-phase catalytic processing of biomass-derived oxygenated hydrocarbons to fuels and chemicals. Angew. Chem. Int. Ed. 46, 7164-7183.

[30] Hayes, D. J., Fitzpatrick, S., Hayes, M. H., Ross, J. R., 2006. The biofine process—production of levulinic acid, furfural, and formic acid from lignocellulosic feedstocks. in: Kamm, B., Gruber, P.R., Kamm, M. (Eds.), Biorefineries—Industrial Processes and Product, 1, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, pp. 139-164.

[31] Rasmussen, H., Sørensen, H. R., Meyer, A. S., 2014. Formation of degradation compounds from lignocellulosic biomass in the biorefinery: sugar reaction mechanisms. Carbohydr. Res. 385, 45-57.

[32] Isikgor, F., Becer, R., 2015. Lignocellulosic biomass: a sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers. Polym. Chem. 6, 4497-4559.

[33] Moreira, L., Filho, E., 2008. An overview of mannan structure and mannan-degrading enzyme systems. Appl. Microbiol. Biotechnol. 79, 165–178.

[34] Antal, M., Mok, W., Richards, G., 1990. Mechanism of formation of 5-(hydroxymethyl)-2-furaldehyde from D-fructose and sucrose. Carbohydr. Res. 199, 91–109.

- [35] Blakeney, A., Harris, P., Henry, R., Stone, B., 1983. A simple and rapid preparation of alditol acetates for monosaccharide analysis. *Carbohydr. Res.* 113, 291–299.
- [36] Viebke, C., 1995. A light scattering study of carrageenan/galactomannan interactions. *Carbohydr. Polym.* 28, 101–105.
- [37] Pollard, M., Kelly, K., Fisher, P., Windhab, E., Eder, B., Amado, R., 2008. Investigation of molecular weight distribution of LBG galactomannan for flours prepared from individual seeds, mixtures, and commercial samples. *Food Hydrocoll.* 22, 1596-1606.
- [38] Heuckendorff, M., Pedersen, C. & Bols, M., 2011. The influence of neighboring group participation on the hydrolysis of 2-O-substituted methyl glucopyranosides. *Organic Letters* 13, 5956-5959.
- [39] Jensen, H. & Bols, M., 2003. Steric effects are not the cause of the rate difference in hydrolysis of stereoisomeric glycosides. *Organic Letters* 5, 3419-3421.
- [40] Capon, B., 1969. Mechanism in carbohydrate chemistry. *Chem. Rev.* 69, 407-498.
- [41] Dea, I., McKinnon, A., Rees, D., 1972. Comparative studies of the mechanical properties of mixed gels formed by kappa carrageenan and tara gum or carob gum. *J. Mol. Biol.* 68, 153–172.
- [42] Petkowicz, C., Reicher, F., Mazeau, K., 1998. Conformational analysis of galactomannans: from oligomeric segments to polymeric chains. *Carbohydr. Polym.* 37, 25–39.
- [43] Azero, E., Andrade, C., 2002. Testing procedures for galactomannan purification. *Polym. Test.* 21, 551–556.
- [44] Dakia, P., Wathelet, B., Paquot, M., 2010. Influence de la teneur en galactose sur les interactions moléculaires et sur les propriétés physico-chimiques des galactomannanes en solution. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 14, 213–223.

8

Conclusions générales et perspectives

Les polysaccharides, et plus spécifiquement les hémicelluloses sont des classes de molécules fort importantes et fort intéressantes. Plusieurs voies de valorisation s'offrent à elles. Elles peuvent être utilisées telles quelles pour des applications spécifiques où leurs propriétés physiques sont ciblées. Elles peuvent également être transformées en composés à plus haute valeur ajoutée, pour des applications où leurs spécificités chimiques ou biologiques sont mises en avant. Elles représentent enfin un potentiel de valorisation indispensable au développement de bioraffineries compétitives, par la fourniture de molécules plateformes. Aucune voie de valorisation privilégiée n'est cependant préconisée dans ce travail afin de s'affranchir d'un contexte temporel changeant et fluctuant.

Les galactomannes, et plus spécifiquement la gomme de caroube (LBG) font partie de cette classe de molécules. Actuellement la LBG trouve ses principaux débouchés en tant que texturant dans l'industrie agro-alimentaire. Certaines applications à plus haute valeur ajoutée sont également mentionnées dans la littérature, telles qu'une utilisation comme source de production de prébiotiques. La LBG n'est pas utilisée comme matière source dans les procédés de transformation des bioraffineries (en raison de son coût significatif). Par sa composition, elle reste cependant fort proche d'hémicelluloses valorisables en molécules plateformes et constitue dès lors un cas d'étude « modèle » justifiant que l'on s'y intéresse.

Quels que soit le secteur de valorisation et les applications ciblées, l'utilisation judicieuse de la LBG s'est toujours basée sur un certain empirisme. L'amélioration des connaissances théoriques sur le lien existant entre la structure chimique de cette fibre, son comportement et ses propriétés permettrait toutefois de cibler plus spécifiquement et plus efficacement des applications dans les trois grands secteurs de valorisation des hémicelluloses. C'est l'objectif spécifique que s'est fixé ce travail de recherche doctorale.

Au niveau méthodologique, l'approche retenue pour traiter la problématique a été, dans un premier temps, de dresser un état des lieux complet de la thématique (Ch. 1, 2 & 3), avant d'étudier spécifiquement et à travers l'expérimentation, la question de l'impact de la structure sur le comportement et les propriétés à différents niveaux (Ch. 4, 5 & 6).

Du travail de synthèse, il ressort que dans le cas des galactomannanes de caroube, la structure chimique, représentée par le degré de substitution en galactose (DS_{Gal}) et la masse moléculaire, a un impact indéniable sur les propriétés du polymère. Le

DS_{Gal} , si souvent cité, ne semble toutefois pas être une caractéristique prévisionnelle suffisante du comportement. C'est une donnée utile, mais incomplète. Le motif de distribution des substituants galactosyls semble être le paramètre qui doit influencer le plus le comportement du polymère.

Afin d'étudier spécifiquement cette hypothèse, une gomme de caroube brute a été purifiée et extraite de façon fractionnée et soustractive, à deux températures différentes (25 °C et 80 °C), afin d'obtenir deux fractions distinctes (GM25 et GM80). Celles-ci ont été caractérisées structurellement. Les deux fractions récoltées présentent des structures proches, mais néanmoins différentes. Ainsi, la fraction GM80 se distingue de la fraction GM25 par des longueurs de chaînes plus importantes. Elle est aussi moins substituée en galactose et présente surtout une alternance de zones non substituées et densément substituées sur la chaîne principale du polymère (là où la répartition des substituants sur la fraction GM25 est légèrement plus homogène). Ces légères différences de structure peuvent donc être générées par la température de solubilisation choisie. Le procédé d'extraction et de purification utilisé est donc en mesure de conditionner les caractéristiques structurelles de la gomme et les propriétés qui en découlent.

En milieu aqueux, ces petites différences de structure au sein du même polymère de base vont générer des comportements variés à différents niveaux d'observation (solutions diluées, solutions concentrées et état gel).

Le travail a d'abord mis en exergue que des interactions spécifiques non covalentes et labiles existent entre les chaînes de galactomanannes (principalement pour la fraction GM80), tandis que la rhéologie de la fraction GM25 est plutôt influencée par sa masse moléculaire. Les interactions interchaînes sont corrélées à la présence de zones lisses. Le même mécanisme « hydrophobe » induit également l'apparition d'interactions intrachaines conduisant, en régime dilué, à une diminution du volume hydrodynamique, responsable de la viscosité intrinsèque.

Au-delà du régime dilué, la fraction GM80 nécessite une montée en température, imposée par ses caractéristiques structurales, pour atteindre la solubilisation. Cette structure favorise également les phénomènes d'agrégaions moléculaires et les hyperenchevêtrements qui en résultent. Après la montée en température nécessaire à la mise en solution, la viscosité initiale de telles solutions sera plus importante et les caractères rhéofluidifiants et élastiques, plus marqués que pour la fraction GM25. La présence de zones lisses accroît également les possibilités de formation de monogels

(lorsque la concentration en polymère augmente) ou de gels associés (lorsque des polysaccharides d'autres natures sont ajoutés au milieu pour leurs effets synergiques), forts et solides. La fraction GM25 présente l'avantage d'être soluble à froid en milieu aqueux. Elle génère des solutions directement visqueuses, sans étapes préalable de montée en température. Moins pourvues en zones lisses, elles présentent des possibilités d'agrégation plus limitées et montrent dès lors des viscosités plus faibles et un caractère rhéofluidifiant moins marqué, ainsi qu'un comportement plus visqueux qu'élastique. Les possibilités de formation de gels sont également plus limitées.

Cette étude fondamentale de la viscosité des galactomannanes en lien avec leur structure permet d'envisager des applications qui cibleraient prioritairement des structures de polymères définies pour des applications spécifiques. Une fraction telle que la fraction GM25 est intéressante car elle confère de la viscosité à basse température à un milieu aqueux, en évitant une montée en température onéreuse, non indispensable ou risquée pour la formulation ciblée, ainsi qu'une opération de mélange. Cette fraction conserve également ses propriétés viscoélastiques même dans un milieu à la concentration saline significative. A l'inverse, la fraction GM80 est capable de fournir une grande viscosité, même en faible concentration, ce qui diminue la charge en additif d'une formulation ciblée. Elle nécessite cependant des températures plus élevées lors de l'opération de mélange.

A ce niveau, deux voies de recherche pourraient encore être investiguées pour améliorer la connaissance du sujet. D'un point de vue plus appliqué, il pourrait être intéressant de fractionner la gomme de caroube brute en un panel plus large de fractions, en jouant sur la température, afin d'identifier des fractions présentant des propriétés rhéologiques spécifiques, en lien avec leur structure et ainsi parfaire encore un peu plus la connaissance sur la relation structure-fonction des galactomannanes, tout en envisageant de nouvelles applications et de nouveaux débouchés pour les fractions produites (ou pour toute autre fibre présentant des caractéristiques similaires). D'un point de vue plus fondamental, il faut constater que si la corrélation entre la présence de zones lisses, les interactions interchaînes et les propriétés qui en découlent a été établie, la présence physique des zones de jonction n'a cependant pas été démontrée. La RMN en phase solide pourrait être une technique intéressante pour démontrer la différence de mobilité au sein de la population de mannosyls de gels de galactomannanes, qui serait le résultat attendu d'interactions spécifiques entre les chaînes voisines. Une des difficultés liées à la mise en œuvre d'une telle démarche est la faiblesse du signal des gels préparés (dans une gamme de concentrations envisageable pour des applications industrielles potentielles). Cette démarche avait été initiée dans le cadre de ce travail de

recherche, mais les spécificités de ce type d'étude impliqueraient une nouvelle recherche à part entière (dépassant le cadre de la thèse). La tomographie RX pourrait également être un outil utile à cette fin.

Dans une optique de bioraffinage et/ou de production de composés à plus haute valeur ajoutée, d'autres types de propriétés sont plus intéressantes que celles liées à la rhéologie. La résistance et le comportement lors de l'hydrolyse sont plus spécifiquement utiles à étudier et à mettre en lien avec la structure.

L'hydrolyse en « high temperature water » (HTW) a été utilisée pour dépolymériser les galactomannanes de caroube. Les réactions en HTW présentent de grandes similitudes avec l'hydrolyse acide. Dans ces conditions, la fraction GM25 présente une plus grande stabilité et une meilleure résistance à l'hydrolyse de la chaîne (rupture β), vraisemblablement stabilisée par une présence plus importante de galactosyls latéraux. La fraction GM80 est par ailleurs plus apte à l'hydrolyse de ses galactosyls latéraux (rupture α , favorisée par effet anomère), alors qu'elle en possède moins au départ que la fraction GM25. Une fois encore un lien avec la distribution des galactosyls le long de la chaîne principale a été établi. Plus spécifiquement, deux hypothèses, non exclusives entre elles, ont été avancées pour interpréter ces résultats surprenants. Il pourrait s'agir d'une interaction plus prononcée (par liaisons H ou encombrement stérique) entre les galactosyls latéraux des zones densément substituées de la fraction GM80. Ces interactions auraient pour effet de déstabiliser les liaisons α en les rendant plus labiles. La conformation de la fraction GM80 en milieu aqueux pourrait également jouer un rôle en repoussant les galactosyls latéraux vers la périphérie (dès lors plus exposés aux conditions du milieu), sous l'effet des interactions hydrophobes interchaînes ou intrachaînes des zones non substituées en galactosyls (zones « lisses »).

Ces hypothèses pourraient être affinées par une modélisation informatique du comportement conformationnel des fractions (sur base de la caractérisation structurale réalisée) dans les conditions réactionnelles retenues (pour minimiser leur énergie interne). D'un point de vue pratique, il serait intéressant également de décliner les conditions HTW ou la matière source utilisée (au niveau de la structure) pour cibler la production de fragments ou de composés spécifiques pour certaines applications, en tant que molécules plateforme (HMF, 2F, hexose, etc.) ou en tant que molécules à plus haute valeur ajoutée (galacto-manno-oligosaccharides).

Au niveau méthodologique, certaines améliorations sont également possibles. Cette thèse ne s'inscrivait pas dans une logique de chimie pure et son objectif n'était pas de mettre au point ou d'améliorer des techniques de mesures, mais plutôt d'utiliser des méthodes d'analyses issues de publications scientifiques afin de comparer les résultats acquis à ceux de la littérature sur une même base. Toutefois, les nouvelles avancées (tant méthodologiques qu'analytiques) ou le recours à d'autres techniques ouvrent des perspectives d'amélioration qualitative de la quantification ou de l'élucidation structurale des espèces chimiques dont ce travail fait l'objet. La finalité poursuivie par une telle démarche serait différente, très complémentaire et donc tout aussi intéressante.